

Avaliação microbiológica de vinho engarrafado

Inês de Oliveira Duarte Gerardo Valada

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito-Ferreira

Orientadora: Engenheira Ana Carla Matos Silva

Júri :

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia na Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito-Ferreira, Professor auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia na Universidade de Lisboa; ; Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de evidenciar, que foram várias as pessoas que, contribuíram de alguma forma para este trabalho. Todas elas, sem exceção, fizeram com que estes meses de trabalho fossem compensadores.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Manuel Malfeito por me ter aceite no seu grupo de trabalho. Obrigada Professor, pelos ensinamentos e constante boa disposição, e especialmente pelas vezes que me puxou para cima, que foram muitas. Obrigada pelas palavras sábias e pelo carinho demonstrado.

Seguidamente, tenho de agradecer à Engenheira Carla, pela paciência, apoio e por estar sempre disposta a ajudar-me. Sem a Engenheira Carla teria sido muito mais difícil. À D. Manuela, porque é uma querida e sempre muito preocupada e à D. Lena que com a sua boa disposição matinal que nos faz logo acordar.

À Marta Egídio, a minha amiga “chicote”, ainda bem que existes para me dares na cabeça, e motivares. Obrigada por me teres acompanhado ao longo de todo este processo. Obrigada por todo o apoio, pelas sugestões, por tudo. Não sei como te irei compensar.

À Rafaela que me acompanhou desde o início e me proporcionou bons momentos de descontração. Obrigada por me ouvires horas e horas a fio e pelas horas de almoço bem passadas em conjunto com a Sara.

À minha irmã, Maria, pela paciência, companheirismo, por me fazeres rir até ficar com dores de barriga, e por me teres ajudado nesta parte final. Obrigada por seres este misto de seriedade e alegria.

Agradeço também à minha mãe, Nanucha, és a maior. Obrigada pelos conselhos, pelo colo, por viveres as minhas dores como se fossem tuas e por acreditares sempre em mim. És uma força da natureza.

À minha avó Júlia que está sempre a torcer pelo meu melhor, que se disponibiliza sempre para me ajudar e que confia sempre nas minhas decisões. Tenho de agradecer ao meu avô António, que já não me acompanhou no decorrer desta etapa, mas sei que do sítio onde está, se encontra muito orgulhoso da sua menina. Obrigada Avós sem vocês nada disto seria possível.

Por fim, gostaria de agradecer ao Luís por me ouvir a reclamar, por me aturar quando parece que tudo vai desabar. E por pura e simplesmente estares sempre ao meu lado.

RESUMO

A produção de vinho resulta principalmente da ação de diversos microrganismos como leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Ação microbiana, essa, que tem de ser controlada. Contudo, apesar de existir uma vasta quantidade de informação sobre os microrganismos pertencentes ao consórcio microbiano do vinho, é conveniente haver uma atualização do conhecimento. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade microbiana associada ao produto final já engarrafado recorrendo a técnicas atuais de identificação com base na sequenciação do DNA. Deste modo, procedeu-se à análise microbiológica de vinhos entregues no laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia. Os microrganismos isolados foram submetidos a testes fenotípicos e, consoante o resultado, foram selecionados para identificação molecular. No produto final foram identificadas 10 espécies diferentes, incluindo as principais espécies de alteração de vinhos: *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* e *Zygosaccharomyces bailii*. Surpreendentemente, não foram isoladas bactérias lácticas ou acéticas, mas sim bactérias esporuladas pertencentes aos géneros *Bacillus* spp., *Brevibacillus* spp. e *Paenibacillus* spp., provavelmente sem influência na qualidade do vinho mas indicadoras das condições de higiene do processo de engarrafamento..

Palavras-chave: vinho, engarrafamento, identificação molecular, leveduras de alteração, bactérias esporuladas

ABSTRACT

Wine production are mainly the result of the action of various microorganisms such as yeast, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. Microbial action, should be controlled. However, despite a vast information of these microorganisms that belongs to the wine microbial consortium, there are microorganisms that are not found in the bibliography. The objective of this study was evaluate the microbial diversity associated with the final product already bottled. Thus proceeded to the microbial analysis of wines that were provided by various wineries to the Instituto Superior de Agronomia. The isolated microorganisms were submitted to phenotypic tests and according to the results were selected to molecular identification. It was found that, despite of all the information and all available products there are still some gaps in both hygiene and the application of preservatives, in the cellars where the wines come from. This can be concluded because at the final product existed a major highlight of yeasts, in 25 isolated yeasts, 10 came from different species. Highlights that from those 25 species 10 are considered as spoilage yeasts and which are present in the wine microbial consortium. However it was also evidenced the existence of lactic acid bacteria that probably would not have great influence at wine's quality, identified lactic bacteria are not considered as belonging to wine microbiota existence of 7 species of endo-forming bacteria spores that would not have great influence at wine's quality, because they are like form of spores

Keywords : wine, wine microbial consortium, bottling , molecular identification.

EXTEND ABSTRACT

Wine microbial consortium is composed by many microorganisms, such as yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria that are present since grapes to the bottle. Despite of wine has high ethanol concentration, low pH and low nutrients concentration, an environment that is not favorable to microorganisms grown, there are some that are resistant to this conditions. This microorganisms belongs to the microbial consortium. However, each species may differently contribute to the improvement/depreciation of wine qualities. The wine's consortium including several yeast species such as: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Dekkera* and *Schizosaccharomyces*. Lactic acid bacteria are also present like: *Oenococcus oeni*, *Pediococcus damnosus*, *P. parvulus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity associated with bottling and the microorganisms that can resist until the final product.

To achieve the aim of this study several bottles of red wine, white and rosé were analyzed, through the wine filtration and selective environments were used to improve the grown of different species of microorganisms. All the isolated microorganisms were submitted to phenotypic tests and according to the results were selected to molecular identification.

Some yeasts that belong to the wine microbial consortium were isolated on wine. Species such as *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Dekkera*. On the other hand the lactic acid bacteria found, *Bacillus spp.*, *Bacillus circulans*, *Brevibacillus circulans*, *Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus humicus*, *Paenibacillus pabuli* and *Paenibacillus spp.* do not belongs to the wine microbiome. The yeasts identified are extremely bad at wine in bottle because at that step the yeasts in cause only have a negative contribution at wine's *flavour*. The lactic acid bacteria don't represent effect on the wine's quality.

In conclusion all microorganisms identified were not supposed to be on that step of the wine's production. So the study take us to conclude that the hygiene of the cellar equipment is not being efficient or the application of preservatives are not sufficient at the cellars where wine provides.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
EXTEND ABSTRACT	vi
1. Introdução	2
1. Introdução.....	3
1.1. O Vinho em Portugal.....	3
1.2. Exportação, consumo e produção	3
1.3. Caracterização do vinho	5
1.3.1.Composição do vinho	6
1.3.2. Microbiota do vinho	6
1.4.Microrganismos de alteração	7
1.4.1. Leveduras de alteração	8
1.4.2.Bactérias Lácticas de alteração.....	10
1.4.3.Bactérias Acéticas de alteração.....	10
1.4.4. <i>Bacillus spp.</i> e <i>Paenibacillus spp.</i>	11
1.5.Prevenção do aparecimento de microrganismos indesejáveis.....	11
1.5.1.Higienização.....	12
1.5.2.Conservantes	12
1.5.2.1.Dióxido de Enxofre (SO ₂).....	13
1.5.2.2.Dimetildicarbonato	13
1.5.2.3.Quitosano	14

1.6.Filtração	14
Objetivos	16
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Recolha das amostras	18
2.2 Análises microbiológicas.....	19
2.2.1. Quantificação de leveduras	20
2.2.2.Quantificação de Bactérias.....	20
2.3. Purificação dos microrganismos.....	21
2.4. Testes fenotípicos.....	21
2.4.1. Leveduras	21
2.4.1.1 Observação microscópica	21
2.4.1.2 Hidrólise da ureia.....	21
2.4.2 Bactérias	21
2.4.2.1 Observação microscópica	21
2.4.2.2. Coloração de Gram	21
2.4.2.3. Teste da catalase	22
2.4.2.4. Teste da oxidase	22
2.5. Métodos moleculares de diagnóstico	22
2.5.1.1 Extração de DNA.....	22
2.5.1.2 Amplificação de DNA	23
2.5.1.3. Sequenciação do DNA amplificado.....	24
2.5.2 Bactérias lácticas	24
2.5.2.1 Extração de DNA.....	24

2.5.2.2 Amplificação de DNA.....	24
2.5.2.3 Sequenciação do DNA amplificado.....	25
2.5.3. Bactérias acéticas	25
2.5.3.1 Extração de DNA.....	25
2.5.3.2 Amplificação de DNA.....	26
2.5.3.3. Sequenciação do DNA amplificado.....	27
3. Resultados e discussão.....	28
3.1 Incidência de bactérias e leveduras	29
3.2. Caracterização das estirpes de leveduras.....	29
3.2.1. Testes fenotípicos	29
3.2.2. Identificação das estirpes isoladas	30
3.2.3. Identificação das estirpes isoladas durante o processo de engarrafamento	33
3.3. Caracterização das estirpes de bactérias	34
3.3.1. Testes fenotípicos	35
3.3.2. Identificação das estirpes isoladas em vinho engarrafado	36
4. Conclusões	39
5. Bibliografia	42
Anexo1. Leveduras isoladas e respectiva sequencia de DNA.....	50
Anexo 2. Bactérias isoladas e respectiva sequencia de DNA.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais componentes do vinho.....	6
Tabela 2- Leveduras de alteração mais representativas do vinho.....	9
Tabela 3- Defeitos provocados por bactérias lácticas	10
Tabela 4- Conservantes utilizados contra leveduras de alteração de vinhos	14
Tabela 5- Amostras analisadas de vinho tinto, rosé e branco.	18
Tabela 6- Amostras de vinho tinto obtidas em diferentes fases do processo de produção...19	
Tabela 7- Meios utilizadas e as respectivas condições de incubação.	20
Tabela 8- Resultados dos testes fenotípicos para bactérias acéticas e lácticas	22
Tabela 9- Componentes da reacção de amplificação com os respectivos, concentração e volume	23
Tabela 10- Componentes da reacção de amplificação para bactérias lácticas com os respectivos, concentração e volume.....	25
Tabela 11- Componentes da reacção de amplificação para bactérias acéticas com os respectivos, concentração e volume.....	26
Tabela 12- Morfologia em meio GYP das diferentes leveduras.....	29
Tabela 13- Identificação das estirpes de leveduras isoladas de vinhos engarrafados.....	31
Tabela 14- Etapas do processo de vinificação e respectivas leveduras identificadas	34
Tabela 15- Testes fenotípicos realizados para bactérias.....	35
Tabela 16- Amostras dos vinhos engarrafados e as respectivas bactérias isoladas.	37
Tabela 17- Frequência de isolamento e significado tecnológico das espécies isoladas em 25 vinhos engarrafados onde foi detectada contaminação microbiana.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Evolução das exportações em valor de vinho.....	4
Figura 2- Evolução da Produção e consumo de vinho em Portugal.....	5
Figura 3- Metáfora referente às leveduras de contaminação.	8
Figura 4- Perfil eletroforético da amplificação do DNA de algumas das leveduras selecionadas para identificação.....	30
Figura 5- Perfil eletroforético da amplificação do DNA de algumas das bactérias isoladas selecionadas para identificação.....	37

ABREVIATURAS

DMDC: Dimetildicarbonato;

DNA: Deoxyribonucleic Acid;

GYC: Glucose Yeast Extract Carbanate;

GYP: Glucose Yeast Peptone;

MRS: Man Rogosa e Sharpe;

.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. O Vinho em Portugal

Presentemente, o consumo de vinho pode ser visto como uma componente cultural de vários países, uma forma de entretenimento ou apenas uma maneira de melhorar a saúde, uma vez que é visto como um alimento funcional, ou seja, um alimento que pode trazer benefícios para a saúde (Hasler, 1998; Bisson *et al.*, 2002). Muitos dos efeitos benéficos do vinho, especialmente do tinto, devem-se aos seus componentes, nomeadamente resveratrol, compostos fenólicos, quercetina e viniferina (Leifert e Abeywardena, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009; Riedel *et al.*, 2012).

A produção de vinho é uma das tecnologias mais antigas da humanidade, sendo atualmente considerada como um dos processos biotecnológicos mais prósperos ao nível comercial (Inês *et al.*, 2008). A cultura do vinho continua muito presente, são realizados diversos eventos sociais de promoção e dinamização dos vinhos envolvendo encontros entre produtores, concursos e provas de vinhos.

O vinho português tem conseguido destacar-se a nível internacional por ser uma proposta única e diferenciadora, baseada na diversidade e singularidade das suas castas e dos seus *terroirs* (IVV, 2014).

1.2. Exportação, consumo e produção

Presentemente a reputação internacional dos vinhos Portugueses é inquestionável. As exportações de vinho português demonstram também este dinamismo do setor, registando um desempenho bastante favorável nos últimos anos, como se pode verificar na figura 1 (IVV, 2014).

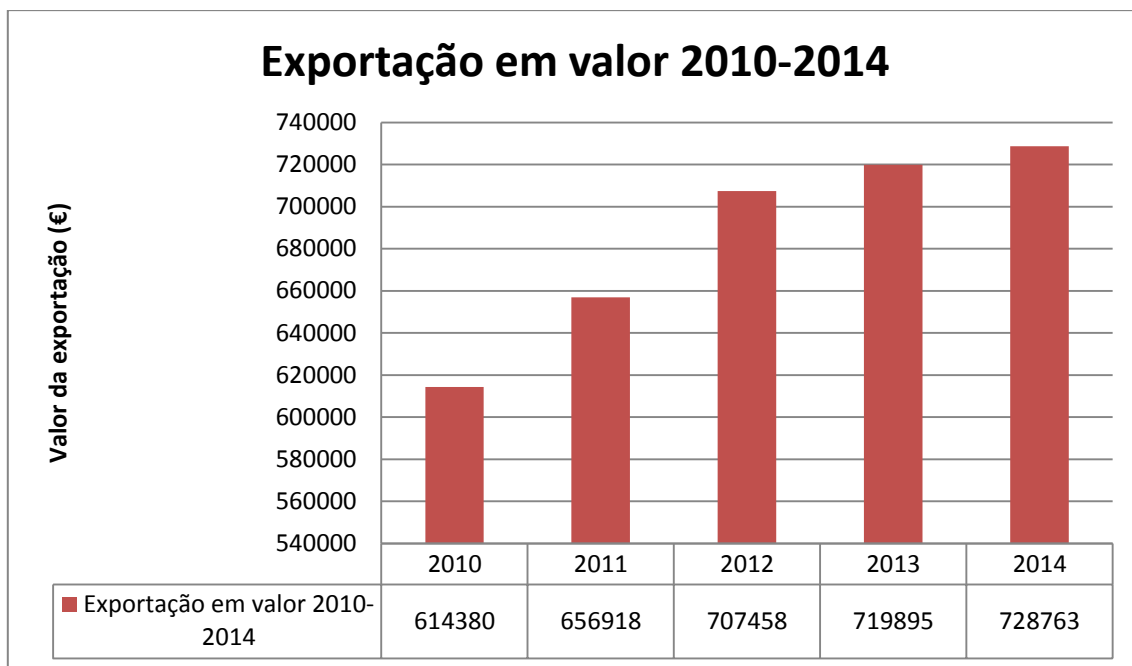


Figura 1: Evolução das exportações em valor de vinho. (Fonte: Instituto da Vinha e do Vinho, 2014)

A figura 2 representa a evolução da produção e consumo de vinho em Portugal nos últimos 14 anos. Através da figura verifica-se que a produção de vinho tem sido bastante inconstante. Estas variações podem ser explicadas pelas condições climáticas e doenças das vinhas, no entanto o país continua a ser autossuficiente em vinho. Relativamente ao consumo não se destacam grandes oscilações, verificando-se um decréscimo do mesmo nos anos 2011/2012, o que pode ser devido à crise económica instalada (OIV, 2013).

Por outro lado, o mercado nacional comprou maior quantidade de vinho entre Janeiro e Junho de 2015 (+3,38%) face ao mesmo período de 2014. O valor gerado pelas vendas aumentou ligeiramente relativamente ao ano anterior, o que conduziu a uma diminuição no preço médio de venda. Por fim, os vinhos certificados aumentaram as vendas tanto em volume como em valor (Nielsen, 2015).

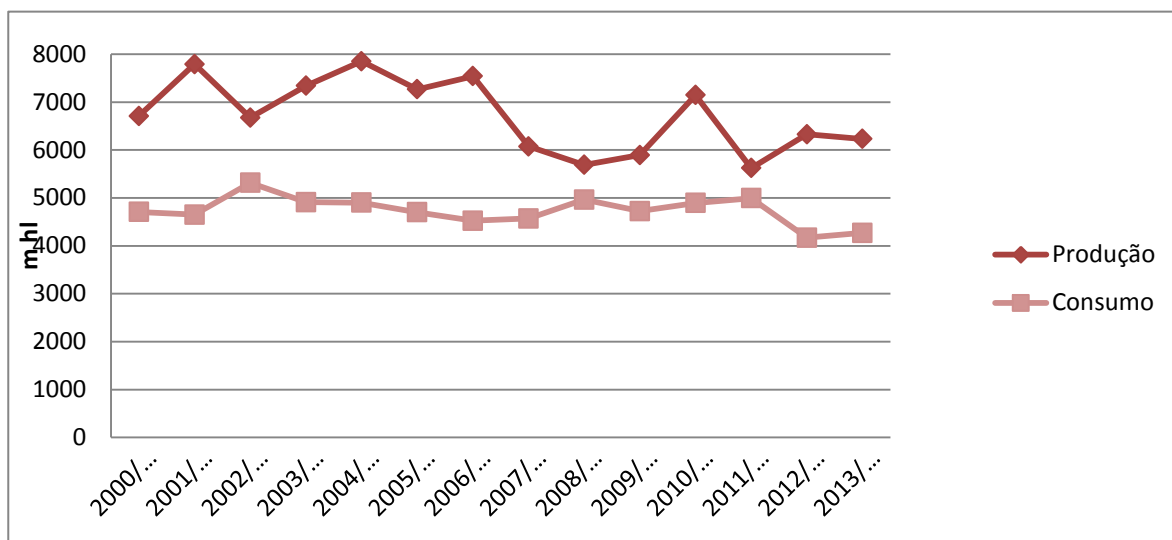


Figura 2: Evolução da Produção e consumo de vinho em Portugal (IVV, 2014)

1.3. Caracterização do vinho

O vinho é o resultado de um processo bioquímico complexo, que começa na vindima continua até à fermentação alcoólica e maloláctica, estágio e engarrafamento. Esta bebida, é um produto natural, fruto de reações bioquímicas, que se iniciam durante a maturação da uva e se estendem até ao engarrafamento (Romano *et al.*, 2003). O vinho engloba uma heterogeneidade de microrganismos que interagem entre si (Capozzi *et al.*, 2015). Dada esta diversidade de elementos presentes, o vinho é considerado um produto elaborado, diferenciando-se assim dos produtos fabricados, os quais são caracterizados por misturas de várias matérias-primas (Rayess *et al.*, 2011).

A diversidade e qualidade dos vinhos resultam do tipo de uva, da qualidade do solo, da localização, do clima e das diferentes técnicas utilizadas ao longo do processo de vinificação (Kunkee e Bisson, 1993; Christaki e Tzia, 2002; Infovini, 2015).

Os processos mais importantes na produção de vinho são a fermentação alcoólica, conduzida pelas leveduras, e a fermentação maloláctica, conduzida pelas bactérias lácticas (Genisheva *et al.*, 2013).

A fermentação alcoólica do mosto é um complexo processo microbiano que envolve um desenvolvimento sequencial de vários géneros de leveduras, sendo estes fortemente afetados pelas condições físico-químicas – pH, concentração de açúcar, quantidade de compostos fenólicos – e pelo processo de vinificação – temperatura, quantidade de sulfuroso adicionado e quantidade de oxigénio (Bisson e Joseph, 2009; Renault *et al.*, 2013).

No final da fermentação alcoólica, quando a população bacteriana atinge as 10^6 UFC.mL⁻¹, inicia-se a fermentação maloláctica, responsável pela descarboxilação de ácido L-málico em ácido L-lático sendo esta fermentação essencial para a redução da acidez, para o aumento

das características organoléticas e para o aumento da estabilidade microbiológica do vinho (Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999; Lerm *et al.*, 2010). Esta fermentação é realizada pelas bactérias lácticas presentes no vinho, principalmente pela *Oenococcus oeni* (Nisiotou, *et al.*, 2014).

1.3.1. Composição do vinho

A composição e qualidade do vinho dependem da própria composição da uva, ou seja, dependem de características genéticas, condições de cultivo da vinha, maturação da uva na colheita e das práticas enológicas. Algumas das características organoléticas do vinho dependem do microbiota presente (Cocolin e Ercolini, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011; Rayess *et al.*, 2011). A composição do vinho depende também da presença de leveduras, bactérias e dos seus metabolismos (Rayess *et al.*, 2011). Os principais componentes presentes no vinho encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Principais componentes do vinho (Rayess *et al.*, 2011)

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Água	750 – 900
Etanol	69 – 121
Ácidos orgânicos	3 – 20
Minerais	0,6 – 2,5
Compostos azotados	0,5 – 5
Compostos fenólicos	1,5 – 6
Polissacarídeos	0,4 – 0,7

1.3.2. Microbiota do vinho

O vinho é um produto que resulta da fermentação alcoólica do mosto (Vincenzini, *et al.* 2005). Desde que Pasteur, em 1873, evidenciou a contribuição microbiológica patente no vinho, que este tema continua a ser alvo de pesquisas. A composição e qualidade do vinho depende de características intrínsecas e extrínsecas, no entanto os microrganismos têm um papel bastante significativo na qualidade do produto final (Cocolin e Ercoli, 2008). Aliás, os microrganismos têm um papel de destaque na determinação da composição química do vinho. O vinho é o produto da fermentação de sumo de uva, principalmente devido à atuação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O processo tecnológico envolve uma vasta gama de espécies de levedura com diferentes contribuições que influenciam a qualidade do produto final (Malfeito-Ferreira, 2014). Os microrganismos afetam a colheita da uva, a fermentação, metabolizam os açúcares da uva e outros componentes em etanol, dióxido de

carbono e centenas de produtos finais que coletivamente, contribuirão para a sutileza e singularidade de cada vinho (Fleet, 2003). Muitos dos microrganismos presentes no vinho tanto podem ter proveniência da matéria-prima, como podem estar presentes nos equipamentos e superfícies utilizadas em adega (Malfeito-Ferreira, 2014).

O consórcio microbiano do vinho corresponde aos microrganismos que têm a capacidade de sobreviver e de se desenvolverem nas uvas e no vinho (Barata *et al.*, 2012). A grande diversidade de microrganismos que estão inerentes na produção de vinho engloba as leveduras, bactérias acéticas, lácticas e fungos (Cocolin e Ercoli, 2008).

1.4.Microrganismos de alteração

Uma das maiores preocupações na tecnologia enológica são os problemas de instabilidade causados por leveduras presentes no vinho (Malfeito-Ferreira e Loureiro, 1995). Entende-se por alteração microbiana de um vinho, uma mudança na sua composição química normal por ação de determinados microrganismos. Esta definição tem origem no primeiro conceito de Pasteur, sendo nessa época qualquer alteração do vinho denominada doença (Lepe e Leal, 1992).

As substâncias produzidas pelos microrganismos que crescem no vinho como as leveduras, bactérias lácticas e acéticas, produzem substâncias que podem influenciar as características organoléticas de um bom vinho (Hudelson, 2011). Mesmo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* que é uma levedura determinante na fermentação alcoólica, pode alterar o aroma do vinho, em condições menos favoráveis para esta levedura (Hudelson, 2011).

Metaforicamente, a designação levedura de deterioração assemelha-se a um *iceberg*. Ou seja, 5% da deterioração é facilmente visível e é causada por uma espécie altamente fermentativa. Os restantes 95% da deterioração são mais difíceis de constatar e pode ser causada pela contaminação devida a higienização insuficiente das superfícies de trabalho (Stratford, 2006).

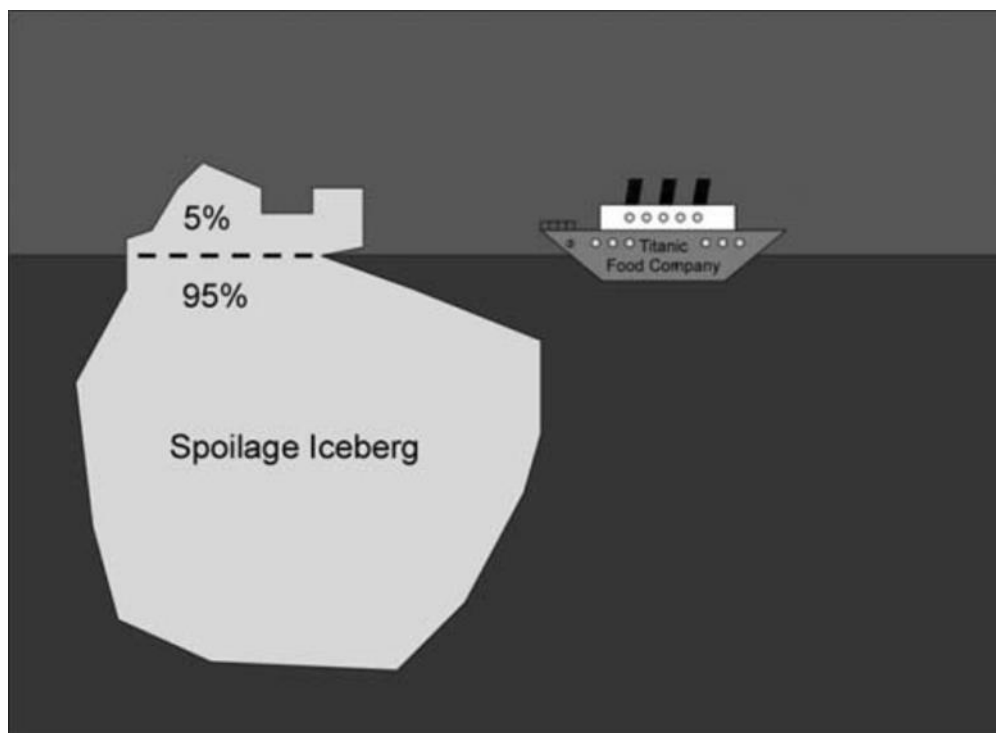


Figura 3: Metáfora referente às leveduras de contaminação.

No entanto, existem três fatores que limitam o desenvolvimento de determinados microrganismos no vinho: o teor alcoólico, uma vez que o etanol em determinadas concentrações é um excelente antisséptico; pH baixo, normalmente inferior a 3,5; e as baixas temperaturas a que esta bebida está sujeita após a época de vinificação (Mislivec *et al.*, 1992).

1.4.1. Leveduras de alteração

Designa-se por levedura de alteração uma espécie que tem a capacidade de provocar alteração. São consideradas apenas as leveduras que ao serem isoladas de um alimento alterado e são inoculadas num alimento saudável, provocam a sua deterioração (Stratford, 2006).

Os taxonomistas reconhecem atualmente cerca de 850 espécies de leveduras, das quais aproximadamente 20% são facilmente isoladas em vinhos, mosto de uva ou ambiente de adega, contudo, só algumas parecem assumir um papel significativo como agentes de alteração (Loureiro, 1996; Malfeito-Ferreira, 2014). Na indústria do vinho, a fermentação resulta da ação de várias espécies de leveduras e bactérias, o que torna difícil distinguir os efeitos benéficos da atividade contaminante (Fugelsang e Edwards, 2007). Atualmente, as leveduras são consideradas como os microrganismos contaminantes mais preocupantes (Deak e Beuchat, 1995). As principais leveduras de alteração do vinho são as pertencentes

aos géneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Tabela 2- Leveduras de alteração mais representativas do vinho (Malfeito-Ferreira e Loureiro, 1995).

Espécie	Problema/ Composto	Ocorrência*
Espécies Oxidativas		
<i>Pichia anomala</i>	Véu, aroma /acetato de etilo	V; A
<i>Pichia membranifaciens</i>	Véu, aroma /ésteres	V; A
<i>Candida spp.</i>	Véu, aroma/ ésteres	A
Espécies Fermentativas		
<i>Kloeckera apiculata</i>	Aroma/ ésteres	V
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Aroma a suor de cavalo e a rato; aumento da acidez volátil/ etilfenol, piridinas e ácido acético	A; E; V
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Aroma/ ésteres	V
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Aroma (acetaldeído)	V; A; E
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Escurecimento; refermentação	A; E
<i>Zygosaccharomyces spp. (Z. bailli, Z. bisporus, Z. rouxii, Z. microelipsoides)</i>	Sedimentos; escurecimento; refermentação	A; E
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Sedimentos; escurecimento; refermentação	A; E
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Aroma; perda de acidez fixa; aumento da acidez volátil	V; A

* V- Vinificação; A- Armazenamento; E- Engarrafamento

1.4.2. Bactérias Lácticas de alteração

As bactérias lácticas são um grupo de microrganismos procariontes com a capacidade de converter ácido málico em ácido láctico. Esta transformação designa-se por fermentação maloláctica ou fermentação secundária nos vinhos. Apesar de serem aerotolerantes, são um grupo de bactérias característico de habitats não aeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutritivo e que suportam valores de pH muito baixos (Inês *et al.*, 2008; Nisiotou, *et al.*, 2014). Estas são responsáveis pela fermentação maloláctica que consiste numa descarboxilação de ácido L-málico em ácido L-láctico e CO₂, principalmente por *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus plantarum* (Lerm *et al.*, 2010). Esta fermentação secundária, nos vinhos, reduz a acidez, promove a estabilidade microbiana e melhora as características organolépticas (Rodas *et al.*, 2003). Contudo, estes microrganismos são responsáveis por alguns defeitos no vinho como produção de aromas desagradáveis, redução da cor e formação de aminas biogénicas (Nisiotou *et al.*, 2014). Na tabela 3 encontram-se listados alguns dos defeitos e os agentes responsáveis pelos mesmos.

Tabela 3- Defeitos provocados por bactérias lácticas (adaptado de: Delanoe *et al.*, 2005)

Defeitos provocados por bactérias lácticas			
Defeito	Substâncias produzidas	Características no vinho	Agente Responsável
Volta	Ácido láctico/ ácido acético/ CO ₂	Odor a azedo/ depósito	Género <i>Lactobacillus</i>
Amargura	Ácido pirúvico/ ácido acético	Gosto amargo/ matéria corante alterada	Género <i>Lactobacillus</i>
Gordura	Envelope mucilaginoso de dextrases	Consistência oleosa/ desequilíbrio no paladar	<i>Pediococcus damnosus</i>
Pico láctico	Manitol/ ácido acético/ ácido pirúvico/ ácido láctico	Sabor ácido e adocicado	Género <i>Lactobacillus</i>

Este tipo de defeitos, está hoje em dia, a ser reduzido, devido às melhores condições de higiene bem como da prevenção que é cada vez mais adquirida pelos produtores de vinho (Delanoe *et al.*, 2005)

1.4.3. Bactérias Acéticas de alteração

As bactérias acéticas são organismos ubíquos que estão bem adaptadas a ambientes ricos em açúcar e etanol. Esta família de bactérias gram negativas são bem conhecidas pela sua capacidade para produzir ácido acético, o principal componente do vinagre (Bartowsky e Henschke, 2008). As bactérias em causa são microrganismos ligados ao processo de deterioração do vinho que se deve à produção excessiva de ácido acético, pelo que a sua

presença nos vinhos e consequentes efeitos negativos na vinificação têm de ser rigorosamente controlados (García-Ruiz *et al.*, 2014).

As bactérias acéticas desenvolvem-se à superfície dos líquidos fermentados. Estas, oxidam o etanol formando o ácido acético, o aumento da quantidade do ácido acético no vinho, confere um odor picante. Esta deterioração vai formando um véu branco à superfície do vinho, designada de mãe vinagre, que eventualmente pode condensar e depositar-se no fundo. Esta alteração é acompanhada por uma diminuição do teor alcoólico e por um aumento da acidez volátil. O agente causador do pico acético é a bactéria acética *Acetobacter* (Delanoe, *et al.*, 2008)

1.4.4. *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp.

A alteração da composição inicial do vinho, devido à existência de *Bacillus* é rara. Estes microrganismos, podem ser encontrados no solo, na água, mas também podem ser encontrados durante a produção do vinho. No entanto, tanto o vinho, como o mosto, não são o substrato ideal para a propagação destas bactérias, devido ao álcool, mas sobretudo devido à acidez presente no vinho (Vincenzini *et al.*, 2005).

Os microrganismos pertencentes ao género *Paenibacillus* são ubíquos e podem ser encontrados em diversos locais, solo e água, no tecido das plantas, leite cru, fezes de vaca. Para além de que várias enzimas e antibióticos são produzidos por espécies deste género (Jimenez *et al.*, 2007). De facto este género tem bastante relevância tanto na indústria, na produção de diversos componentes, como na agricultura, auxiliando no crescimento de plantas, e algumas espécies promovem a fixação de nitrogénio (Araújo da Silva *et al.*, 2003; Ultee *et al.*, 2013).

1.5.Prevenção do aparecimento de microrganismos indesejáveis

Uma incontrolada proliferação de microrganismos pode, eventualmente, levar a uma deterioração do produto e consequentemente a perdas económicas elevadas. (Fugelsang e Edwards, 2007). Para tal é necessário existir uma adequada lavagem e sanitização dos equipamentos utilizados na vinificação, na utilização de conservantes ou na utilização de processos físicos como a filtração (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

1.5.1.Higienização

A higienização dos equipamentos é uma tarefa que ao ser bem executada, permite não só a redução da maioria das contaminações devido a equipamentos e superfícies mal higienizadas mas também evitar contaminações cruzadas dentro do ambiente de adegas. Esta prática é usualmente definida como um procedimento que permite reduzir o número de células viáveis a um nível aceitável, distinguindo-se da esterilização que tem por objetivo a eliminação da totalidade das células viáveis. Adicionalmente, a higienização tem um segundo objetivo: eliminar os ambientes propícios ao crescimento dos microrganismos.

A higienização consiste na limpeza e desinfecção e é realizada geralmente com água quente e com agentes desinfetantes como soluções de sulfito, vapor ou ozono. Os produtos que contenham cloro na sua composição devem ser evitados, pois estes produtos são responsáveis pelo gosto de rolha no vinho (Fugelsang e Edwards, 2007; Malfeito-Ferreira, 2014). A utilização de materiais de fácil higienização, como o aço inoxidável, permite uma maior eficiência no processo de limpeza. Materiais rugosos como o plástico, a borracha ou a madeira, dificultam a higienização, devido à elevada porosidade (Malfeito-Ferreira, 2010). O material mais difícil, ou quase impossível de higienizar corretamente é a madeira utilizada para a maturação de certos vinhos. As barricas de carvalho são amplamente utilizadas particularmente para os vinhos tintos de alta qualidade. Esta situação representa a maior dificuldade na prevenção da contaminação de *Dekkera bruxellensis* (Malfeito-Ferreira, 2014).

1.5.2.Conservantes

Após o final da vinificação, o vinho deve deixar de ser um meio para a propagação microbiana, leveduras e bactérias (Lonvaud- Funel, *et al.*, 2010)

O controlo do crescimento e da atividade dos microrganismos de alteração exige uma boa compreensão da sua fisiologia, bioquímica e genética (Fleet, 2006). Desta forma são utilizadas algumas formas de prevenção, recorrendo a conservantes, como o dióxido de enxofre (SO₂), o dimetildicarbonato (DMDC) e mais recentemente, o quitosano (Zuehlke *et al.*, 2013).

A atuação dos conservantes ácidos está relacionada com o pH do meio. A forma não – ionizada da molécula confere a característica anti microbiana dos conservantes. Os valores de pKa (pH no qual 50% da molécula (AH) se encontra na forma dissociada) da maioria dos conservantes encontra-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0, portanto a concentração da forma não – dissociada aumenta com o aumento da acidez, garantindo uma maior eficiência no

controle dos microrganismos. A forma não dissociada do conservante penetra através da membrana, tornando-se ionizado após alcançar o interior da célula (Belitz *et al.*, 2004).

1.5.2.1. Dióxido de Enxofre (SO₂)

O Dióxido de Enxofre ou Sulfuroso, como é geralmente designado, é um aditivo usado em várias indústrias alimentares e está especialmente indicado para ser utilizado em alimentos de baixo pH, como sumos de frutos e outras bebidas. Nenhum outro aditivo apresenta um tão largo espectro de propriedades benéficas na vinificação e na conservação dos vinhos. O SO₂ é um poderoso antioxidante, um inibidor de enzimas oxidásicas, que se combina com os produtos de oxidação e sobretudo assegura a inibição de grande parte dos microrganismos prejudiciais. É sem dúvida alguma o melhor e mais usado conservante utilizado na produção de vinho.

No entanto essa utilização tem vindo a ser limitada por questões de saúde humana (Romano *et al.*, 1993; Fracassetti *et al.*; 2015). A concentração de SO₂ molecular num vinho é calculada sabendo a concentração de SO₂ livre e o valor do pH de um determinado vinho. A concentração de SO₂ necessária para prevenir o crescimento de microrganismos varia com o tipo de vinho, pH, temperatura, densidade e diversidade da população microbiana, fase de crescimento microbiano, teor de etanol, entre outros fatores (Fugelsang e Edwards, 2007).

Segundo o Regulamento (CE) Nº 606/2009 de 10 de Julho de 2009, no que respeita às práticas enológicas e as suas restrições, os vinhos que contêm este conservante têm obrigatoriamente de informar no rótulo a adição do mesmo. O limite legal varia com a concentração de teor de açúcar no vinho bem como com a sua cor. Para vinho com < 5 g.L⁻¹ de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose): vinhos Tintos o limite é ≤ 150 mg.L⁻¹, no caso dos vinhos rosé e branco o limite já é um pouco mais elevado, ≤ 200 mg.L⁻¹. Nos vinhos com > 5 g.L⁻¹ de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose), para vinhos tintos o limite é de ≤ 200 mg.L⁻¹, para vinho branco e rosé a concentração deste conservante terá de ser ≤ 250 mg.L⁻¹.

1.5.2.2. Dimetildicarbonato

O dimetildicarbonato (DMDC) é um conservante utilizado na vinificação, particularmente ativo contra leveduras (Costa *et al.*, 2008). O DMDC permite a conservação do vinho durante longos períodos de tempo, inibindo vários microrganismos. Diversos estudos têm evidenciado a capacidade inibitória do DMDC em leveduras, tais como a *Brettanomyces*. No caso das bactérias acéticas e lácticas esta inibição não foi observada. Também este

conservante tem limites máximos de utilização que constam no Regulamento CE Nº 606/2009 de 10 de julho de 2009, sendo de 200 mg.L⁻¹.

1.5.2.3. Quitosano

O quitosano é um polímero que resulta da deacetilação da quitina. O quitosano tem origem de duas formas: i) microbiana, pelo *Aspergillus niger*, e ii) animal, pelo marisco (Zappino *et al.*, 2015). A quitina é obtida do exoesqueleto de crustáceos após tratamentos de desmineralização e desproteinização. A quitina e os seus derivados são renováveis, biocompatíveis, biodegradáveis e não são componentes tóxicos. Possuem ainda propriedades biológicas como anti-cancro, antioxidantes e anti-coagulantes (Hamed *et al.*, 2015). Embora a utilização do quitosano, como conservante na indústria da vinificação, seja relativamente recente, este tem mostrado ser eficiente no controlo do crescimento de leveduras, principalmente para *Z. bailii* e *B. bruxellensis* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004; Zakrzewska *et al.*, 2005). Apesar de a quitina ser retirada, principalmente, do exoesqueleto de insectos, caranguejos, camarão e lagostas, na produção de vinho só pode ter origem microbiológica, através do fungo *Aspergillus niger* (Zappino *et al.*, 2015). Esta situação bem como o limite de aplicação que terá de ser inferior a 0,1 g.L⁻¹ (Regulamento CE Nº 53/2011).

Tabela 4. Conservantes utilizados contra leveduras de alteração de vinhos (adaptado de Stratford, 2006 e Zuehlke *et al.*, 2013).

Conservantes	Aplicação	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>S.codes ludwigii</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. parabailii</i>	<i>Pichia spp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SO₂/ pH4	Vindima/ Estágio/ Engarraamento	x	x	x	x	x	x
DMDC	Engarraamento	x		x	x	x	x
Quitosano	Engarraamento	x	x	x	x		x

1.6. Filtração

A filtração permite a eliminação de uma fase sólida em suspensão numa fase líquida, por passagem através de uma superfície porosa, que constitui o suporte filtrante, destinado a reter as partículas sólidas (Lucas, 2009). No decorrer da filtração existem partículas de dimensões distintas que podem ser eliminadas, desde detritos minerais a microrganismos (Cardoso, 2007)

A estabilidade do vinho pode ser dividida em estabilidade físico-química e estabilidade microbiológica. O processo de filtração apenas assegura, por completo, a estabilidade microbiológica, eliminando bactérias e leveduras (Rayess, 2011).

A filtração pré-engarrafamento é o procedimento mais comum com o fim de alcançar a esterilização do vinho. Existem diversos tipos de filtração, a decisão do tipo de filtração a utilizar, cabe ao enólogo, no entanto o objetivo principal é sempre prevenir e impedir o crescimento microbiano (Malfeito- Ferreira, 2014). Se forem utilizados tamanhos de poros mais grosseiros, devem ser utilizados tratamentos de estabilização para compensar. Alguns vinhos, em particular vinhos tintos mais elegantes não podem ser filtrados ou pasteurizados devido às restrições de qualidade requeridas, no entanto estes vinhos acabam por exigir uma maior quantidade de conservantes com o propósito de diminuir a carga microbiana. Por consequência da ausência de filtração, este tipo de vinhos, mais elegante, é mais suscetível ao aparecimento de defeito correspondente ao odor “suor a cavalo”, provocado pela levedura *Brettanomyces bruxellensis*, ou pela refermentação em garrafa (Malfeito-Ferreira, 2014).

Cada operação de filtração faz parte de uma estratégia global de clarificação, a qual engloba a sedimentação espontânea, a colagem e a centrifugação (Carvalheira, 2011).

Objetivos

Como vimos anteriormente, existe uma grande variedade de microrganismos contaminantes de vinhos e com capacidade para os alterar. Contudo, e apesar de existir uma enorme diversidade de informação sobre estes microrganismos, não existem muitos trabalhos recentes recorrendo às modernas técnicas de identificação molecular por sequenciação de ADN. Por esta razão, pareceu-nos interessante fazer uma atualização das espécies de microrganismos isoladas de vinhos com base nas amostras enviadas por empresas dos vinhos para o ISA e destinadas a análise microbiológica. Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Determinar a diversidade microbiana isolada de vinhos engarrafados;
2. Avaliar a incidência de espécies consideradas perigosas para a estabilidade dos vinhos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Recolha das amostras

Todas as amostras foram recolhidas de garrafas de vinho que foram entregues no Instituto Superior de Agronomia no laboratório de microbiologia enológica, para posterior análise, uma vez que o laboratório presta serviço ao exterior. Estas amostras foram analisadas entre o período de Março e Agosto de 2015 e correspondem a vinhos de 2012 e 2014.

Para este trabalho foram utilizadas 15 amostras de vinho tinto, 7 amostras de vinho rosé e 3 amostras de vinho branco cujos códigos, região proveniente e volume no qual é comercializado, se encontram listados na tabela 5.

Tabela 5- Amostras analisadas de vinho tinto, rosé e branco.

Referência	Origem	Adega	Volume (ml)	Tipo de Vedante
Vinho Tinto				
1VT2013	Lisboa	Adega 1	750	Rolha
2VT2013	Madeira	Adega 2	750	Rolha
3VT2012	Madeira	Adega 2	750	Rolha
4VT2013	Alentejo	Adega 3	750	Rolha
5VT(BB)2013	Beira Interior	Adega 4	5000	—
6VT(BB)2013	Beira Interior	Adega 4	5000	—
7VT2013	Beira Interior	Adega 4	750	Rolha
8VT2014	Alentejo	Adega 5	750	Rolha
9VT2013	Alentejo	Adega 5	750	Rolha
10VT2013	Alentejo	Adega 5	750	Rolha
11VT2014	Tejo	Adega 6	750	Rolha
12VT2014	Alentejo	Adega 7	750	Rolha
13VT2013	Lisboa	Adega 8	750	Rolha
14VT2014	Alentejo	Adega 9	750	Rolha

Vinho Rosé				
1VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
2VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
3VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
4VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
5VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
6VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
7VR2014	Península de Setúbal	Adega 10	750	Cápsula Screw-cap
Vinho Branco				
1VB2013	Alentejo	Adega 11	750	Rolha
2VB2013	Alentejo	Adega 12	750	Rolha
3VB2012	Alentejo	Adega 13	750	Rolha

Foram, também, analisadas amostras de um vinho tinto em diferentes fases do processo de engarrafamento, como se pode perceber na tabela 6.

Tabela 6- Amostras de vinho tinto obtidas em diferentes fases do processo de produção.

Filtração tangencial	Tanque	7 dias após filtração tangencial	21 dias após filtração tangencial	Filtração final	Antes da aplicação de DMDC	Depois da aplicação de DMDC	Garrafa
Amostra 15VT2014.1	Amostra 15VT2014.2	Amostra 15VT2014.3	Amostra 15VT2014.4	Amostra 15VT2014.5	Amostra 15VT2014.6	Amostra 15VT2014.7	Amostra 15VT2014.8

2.2 Análises microbiológicas

A análise microbiológica recorreu à filtração de amostras de vinho por filtros de acetato de celulose [Sartorius Stedim Biotech, Alemanha] com um poro de 0,2 µm. Filtrou-se 1ml, 10ml e 100ml e colocaram-se os filtros em placas de petri (Ø 55 mm), com os diferentes meios selectivos, GYP, MRS+vinho e GYC. A filtração dos vinhos foi realizada numa câmara de

fluxo (Scanlaf, Dinamarca), utilizou-se uma bomba de vácuo (Millipore, Alemanha) para auxiliar a sucção do produto, um quitasato de 500 mL (Pyrex, França) e um Funil esterilizado (Millipore, Alemanha). Todas as placas obtidas foram incubadas nas condições apresentadas na tabela 7.

2.2.1. Quantificação de leveduras

Para a pesquisa de leveduras utilizou-se o meio seletivo GYP (Glucose Yeast Peptone Agar): glucose 20 g.L⁻¹ (Copam, Portugal), extracto de levedura 5 g.L⁻¹ (Biokar Diagnostics, França), peptona 5 g.L⁻¹ (Biokar Diagnostics, França), agar 20 g.L⁻¹ (Hispanagar, Espanha), um anti-fungico, bifenil (Sigma-Aldrich, EUA) 0,08 g.L⁻¹ e um antibiótico, cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA) 0,1 g.L⁻¹, de forma a inibir o crescimento de fungos filamentosos e bactérias, respetivamente.

2.2.2. Quantificação de Bactérias

Para selecionar bactérias lácticas utilizou-se o meio MRS + vinho (De Man, Rogosa e Sharpe): MRS (Biokar Diagnostics, França) 52 g.L⁻¹, agar 20 g.L⁻¹ (Hispanagar, Espanha) a que foi acrescentado, após esterilização, vinho tinto esterilizado (200 mL.L⁻¹); L- cisteína (Merck, Alemanha) 0,1 g.L⁻¹, de forma a diminuir o Oxigénio presente no meio e bifenil (Sigma-Aldrich, EUA) (0,08 g.L⁻¹) para inibir o crescimento de fungos filamentosos.

Para a seleção de bactérias acéticas, foi utilizado o meio GYC (Glucose Yeast Extract-Carbonate) glucose 5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, carbonato de cálcio [Merck, Alemanha] 3 g.L⁻¹, agar 20 g.L⁻¹), a que foi adicionado, após esterilização, bifenil 0,08 g.L⁻¹.

As condições de incubação estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7- Meios utilizadas e as respetivas condições de incubação.

Meio	Período de incubação	Temperatura	Condições
GYP	2-3 dias	25°C	Aerobiose
MRS+vinho	5 dias	30°C	Anaerobiose/ Microaerofília
GYC	5 dias	30°C	Aerobiose

2.3. Purificação dos microrganismos

Após incubação e de forma a isolar os microrganismos obtidos, foram retiradas três a cinco colónias, da mesma ou das várias configurações observadas, sendo posteriormente riscadas em novas placas com os meios MRS+vinho, GYP e GYC. De seguida, e de maneira a obter colónias isoladas, estas foram riscadas pelo menos cinco vezes nos meios correspondentes para cada microrganismo. Garantindo assim colónias puras, para posterior identificação. Após a identificação as estirpes identificadas foram colocadas na coleção de microrganismos do Instituto Superior de Agronomia, onde foram conservadas a -80°C, com os respetivos meios e 15% de glicerol (crioconservante).

2.4. Testes fenotípicos

2.4.1. Leveduras

2.4.1.1 Observação microscópica

Foi realizada uma observação microscópica de todas as leveduras isoladas, com o objetivo de observar o tipo de morfologia.

2.4.1.2 Hidrólise da ureia

Colocou-se biomassa das leveduras isoladas em 5 mL de meio CUA (peptona 1 g.L⁻¹, glucose 1 g.L⁻¹, cloreto de sódio [Merck, Alemanha] 2 g.L⁻¹, vermelho de fenol [May & Baker, Reino Unido] 12 mg.L⁻¹, ureia [Panreac, Espanha] a 20%, (100 mL, pH 6,8), posteriormente incubado a 25°C. Existe uma primeira observação nas 48 horas seguintes, no entanto, só cinco dias após a incubação é que se poderá confirmar resultados. Para este teste utilizou-se como controlo positivo a levedura basidiomiceta *Rhodospiridium toruloides* ISA 1854 e como controlo negativo a levedura ascomiceta *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

2.4.2 Bactérias

2.4.2.1 Observação microscópica

Foi realizada uma observação microscópica de todas as bactérias selecionadas, com o objetivo de confirmar se os microrganismos selecionados eram efetivamente bactérias.

2.4.2.2. Coloração de Gram

Para a realização deste ensaio, foi realizado um esfregaço numa lâmina e, procedeu-se à fixação do mesmo, deixando-o secar ao ar e passando-o posteriormente pela chama, tendo cuidado para evitar o sobreaquecimento. Depois de fixado, o esfregaço foi coberto com

cristal violeta (Merck, Alemanha), durante aproximadamente 1 minuto, posteriormente removeu-se cuidadosamente o excesso com um pouco de água. Seguidamente o esfregaço foi coberto com lugol (Difco, EUA), durante cerca de um minuto, e removido com água corrente. De seguida a lâmina foi coberta com álcool iodado (Merk, Alemanha), que ficou a atuar 1 minuto. Posteriormente, a preparação foi coberta com safranina (Merck, Alemanha), durante aproximadamente 1 minuto, e removeu-se o excesso com um fio de água. Após esta última lavagem, deixou-se secar o esfregaço corado, ao ar, e observou-se o resultado ao microscópio.

2.4.2.3. Teste da catalase

Foi colocada uma “ansada” de biomassa do isolado, numa gota de peróxido de hidrogénio (Continente, Portugal) e observou-se o resultado.

2.4.2.4. Teste da oxidase

Utilizaram-se tiras contendo hidracloreto de tetrametil-p-fenilenadamina (Liofilchem Diagnostici, Itália) que em presença da enzima citocromo-oxidase toma uma coloração azulada caso a oxidase seja positiva.

As bactérias lácticas e acéticas têm diferentes reações aos testes fenotípicos realizados. De acordo com o tipo de reação podem ser diferenciadas em bactérias lácticas e bactérias acéticas. O tipo de reações destes dois tipos de bactérias encontra-se na tabela 8.

Tabela 8- Resultados dos testes fenotípicos para bactérias acéticas e lácticas

Gram	Catálase	Oxidase	Bactéria
Positivo (Roxo)	Negativa	Negativa	Láctica
Negativo (Vermelho)	Positiva/Variável	Negativa	Acética

2.5. Métodos moleculares de diagnóstico

2.5.1 Leveduras

2.5.1.1 Extração de DNA

As leveduras foram incubadas em meio GYP durante 48 horas, a 25 °C. De seguida, foi colocada uma “ansada” de biomassa em 200 µl de água Milli-Q, submetida a 96°C, durante 11 minutos no Dry Block Thermostate (Biosan, Letónia).

2.5.1.2 Amplificação de DNA

Para a identificação molecular, foi realizada uma amplificação de DNA numa mistura de PCR, com o volume total de 25 μL . Para cada amostra de 25 μL , colocada num micro eppendorf, utilizaram-se os primers ITS1 (STABvida, Portugal) e ITS4 (STABvida, Portugal) numa quantidade de 0,4 μM de cada, 1mM de MgCl_2 (nzytech, Portugal), 0,1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl_2 (Nzytech, Portugal) e 1 μL de DNA. Na Tabela 7 constam todos os componentes da reação de amplificação de DNA (PCR): concentrações e volumes utilizados por cada amostra.

Tabela 9- Componentes da reacção de amplificação com os respectivos, concentração e volume*.

Componente	Concentração	Volume 1x*
ITS1 (50nM; STAB-Vida)	0,4 μM	0,2 μL
ITS4 (50nM; STAB-Vida)	0,4 μM	0,2 μL
MgCl_2 (50mM; Nzytech)	1 mM	0,5 μL
Água Mili-Q	—	20,6 μL
Mix NZytag 2x Colourless Master Mix - MgCl_2 separate (50mM; Nzytech)	0,1 U	2,5 μL
Total		24 μL

*O volume dos componentes é multiplicado pelo numero de amostras às quais se quer amplificar o DNA, no entanto adicionou-se sempre uma unidade a esta multiplicação. Ou seja, se existissem dez amostras para amplificar o volume calculado seria para onze amostras.

O mix de PCR foi colocado num eppendorf. Posto isto, agitou-se o Eppendorf e transferiu-se 24 μL da mistura para um micro eppendorf, onde já existia 1 μL da reação de DNA, perfazendo assim os 25 μL . Seguidamente os micro eppendorfs correspondentes a cada amostra são colocados no termociclador (Piko Thermo Scientific, EUA).

A reação de PCR foi realizada num termociclador (Piko Thermal Cycler, Thermo Scientific, EUA), e consistiu numa desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 1 minuto a 94°C, um passo de emparelhamento de 2 minutos a 50°C, e um passo de extensão de 2 minutos a 72°C. A reação foi finalizada com uma extensão de 10 minutos a 72°C, sendo, posteriormente realizado um arrefecimento até aos 4°C. Como controlo positivo foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 e como controlo negativo usou-se *Lactobacillus plantarum* ISA 3960.

Após as 3 horas e 15 minutos de PCR, as amostras foram observadas utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Seakem LE Agarose, Lonza, USA), em presença de tampão TBE 0,5mM. As amostras foram preparadas colocando-se 5 μL do produto de

PCR, 2 µL de GelRed (Biotum, EUA) e 2 µL de loading dye (NZYDNA, Nzytech, Portugal), por cada 10 amostras colocou-se um marcador nos poços extremos de cada conjunto de amostras. Os marcadores foram preparados com 2 µL de GelRed (Biotum, EUA) e 5 µL do marcador (NZYDNA Ladder VI, Nzytech, Portugal). A corrida foi realizada durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 70 V. Seguidamente, o gel foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc (BioRad, EUA), sendo as imagens obtidas e digitalizadas através do *software* Quantity One®.

2.5.1.3. Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado pela STABvida (Portugal), através do método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST consultado em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

2.5.2 Bactérias lácticas

2.5.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA de culturas puras, crescidas em meio MRS, durante 24 h a 30°C foi realizada através do GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EUA).

2.5.2.2 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada numa mistura de PCR, utilizando os *primers* pA (STABvida, Portugal) e pH (STABvida, Portugal), com um volume total de 25 µL, para cada amostra de DNA, contendo 0,4 µM de cada primer, 1mM de MgCl₂, 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂. Esta constituição é multiplicada pelo número de amostras que se preparou e posteriormente colocada num eppendorf, este é agitado e após a agitação retiraram-se 24 µL do mix total e colocou-se em cada micro eppendorf correspondente a cada DNA que se pretendeu codificar. Por fim, adicionou-se 1 µL do DNA da bactéria láctica isolada. Os componentes, concentrações e volumes encontram-se listados na tabela 8.

Tabela 10- Componentes da reação de amplificação para bactérias lácticas com os respectivos, concentração e volume.

Componente	Concentração	Volume 1x
pA (25nM; STAB-Vida)	0,4 µM	0,2 µL
pH (25nM; STAB-Vida)	0,4 µM	0,2 µL
MgCl ₂ (50mM; Nzytech)	1 mM	0,5 µL
Água Milli-Q	–	20,6 µL
Mix NZytag 2x Colourless Master Mix - MgCl ₂ separate (50mM; Nzytech)	0,1 U	2,5 µL
Total		24 µL

A reação de PCR foi realizada num termociclador, e consistiu numa desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 30 segundos a 94°C, um passo de emparelhamento de 30 segundos a 49°C e um passo de extensão de 1 minuto a 72°C. A reação foi finalizada com uma extensão de 5 minutos a 72°C, sendo, posteriormente realizado um arrefecimento até aos 4°C. Foi utilizado como controlo positivo *Lactobacillus plantarum* ISA 3960 e como controlo negativo *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

Os produtos de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em presença de tampão TBE. As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed e 2 µL de loading dye, acrescentou-se ainda um marcador no primeiro e no último poço do conjunto de amostras a identificar com 2 µL de GelRed e 5 µL do marcador. A corrida foi realizada durante 60 minutos a uma voltagem de 70 V. Finalmente, o gel foi observado com o mesmo procedimento descrito no ponto 2.6.1..

2.5.2.3 Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST.

2.5.3. Bactérias acéticas

2.5.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA de culturas puras, crescidas em meio GYC, durante 24 h a 30°C foi realizada através do GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EUA).

2.5.3.2 Amplificação de DNA

A amplificação de DNA foi realizada numa mistura de PCR, utilizando os *primers* Ac1 (STABvida, Portugal) e Ac3 (STABvida, Portugal), com um volume total de 25 µL, para cada amostra de DNA, contendo 0,4 µM de cada primer, 1mM de MgCl₂, 0.1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl₂. O procedimento para preparação do mix de PCR para amplificar o DNA das bactérias acéticas foi o mesmo procedimento citado no ponto 2.6.2.2. Os componentes, concentrações e volumes encontram-se listados na tabela 9.

A reação de PCR foi realizada num termociclador, consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 94 °C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um contendo um passo de desnaturação de 1 minuto, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 2 minutos, a 64°C, e um passo de extensão de 2 minutos, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 10 minutos, a 72 °C, sendo, posteriormente, realizado um arrefecimento até aos 4 °C. Como controlo positivo utilizou-se *Acetobacter cerevisiae* ISA 4409 e como controlo negativo usou-se *Escherichia coli* ISA 3967.

Tabela 11- Componentes da reação de amplificação para bactérias acéticas com os respectivos, concentração e volume.

Componente	Concentração	Volume 1x
AC1(25nM; STAB-Vida)	0,4 µM	0,2 µL
AC3 (25nM; STAB-Vida)	0,4 µM	0,2 µL
MgCl ₂ (50mM; Nzytech)	1 mM	0,5 µL
Água Milli-Q	—	20,6 µL
Mix NZytaq 2x Colourless Master Mix - MgCl ₂ separate (50mM; Nzytech)	0,1 U	2,5 µL
Total		24 µL

Os produtos de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,5%, em presença de tampão. As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed e 2 µL de *loading dye*. A corrida foi realizada durante 60 minutos, a uma voltagem constante de 70 V. Finalmente, o gel foi observado através de raios ultravioleta no GelDoc, sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do *software* Quantity One®.

2.5.3.3. Sequenciação do DNA amplificado

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma BLAST.

3. Resultados e discussão

3.1 Incidência de bactérias e leveduras

Ao todo, foram analisados 15 vinhos tintos, 7 vinhos rosé e 3 vinhos brancos. As leveduras foram isoladas de 11 tintos e 3 brancos enquanto as bactérias foram isoladas de 4 tintos e dos 7 vinhos rosé. Em duas amostras de tinto não foram isoladas leveduras, enquanto noutras duas foram isoladas leveduras e bactérias. Em seguida descreve-se a origem e a identificação de cada um dos microrganismos isolados, separando as espécies de leveduras das espécies de bactérias.

3.2. Caracterização das estirpes de leveduras

3.2.1. Testes fenotípicos

As 25 estirpes de leveduras foram isoladas dos vinhos brancos e tintos foram maioritariamente ascomicetas (24 estirpes), como seria de esperar em face do tipo de leveduras com capacidade de sobrevivência em vinhos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). A tabela 12 descreve a origem das estirpes bem como uma descrição sumária da morfologia das colónias.

Tabela 12- Morfologia em meio GYP das diferentes leveduras

Estirpes	Origem	Teste da urease	Descrição	Contagens (1 ml)
Vinho Tinto				
1L	1VT2013	Ascomiceta	Pequenas, brancas	33 UFC
2L	1VT2013	Ascomiceta	Pequenas, brancas, redondas	21 UFC
3L	1VT2013	Ascomiceta	Grandes, brancas, redondas	3 UFC
4L	2VT2013	Ascomiceta	Grande bege, centro mais evidente	2 UFC
5L	2VT2013	Ascomiceta	Pequenas, redondas, azuladas	4 UFC
6L	3VT2012	Ascomiceta	Grandes, brancas	15 UFC
7L	5VT(BB)2013	Ascomiceta	Médias, rosa claro	1 UFC
8L	5VT(BB)2013	Ascomiceta	Pequenas, brancas	3 UFC
9L	6VT(BB)2013	Ascomiceta	Pequenas, bege	Incontável
10L	7VT2013	Ascomiceta	Grande, branca	45 UFC
11L	8VT2014	Ascomiceta	Médias, beges	53 UFC
12L	9VT2013	Ascomiceta	Médias, brancas	1 UFC
13L	9VT2013	Ascomiceta	Médias, rosa, rugosa	107 UFC
14L	10VT2013	Ascomiceta	Pequenas, rosa brilhante	110 UFC
15L	13VT2013	Ascomiceta	Pequenas, brancas	26 UFC
16L	13VT2013	Ascomiceta	Médias, brancas	3 UFC
17L	13VT2013	Ascomiceta	Médias, redondas, brancas	18 UFC
18L	13VT2013	Ascomiceta	Médias, rosa claro	6 UFC
19L	14VT2014	Ascomiceta	Aglomeradas, brancas, rugosas	129 UFC

Vinho Branco				
20L	1VB2013	Ascomiceta	Pequenas, brancas	98 UFC
21L	1VB2013	Ascomiceta	Médias, beges	6 UFC
22L	2VB2013	Ascomiceta	Médias, Rosa Forte	2 UFC
23L	2VB2013	Basidiomiceta	Pequenas, bege	13 UFC
24L	3VB2012	Ascomiceta	Médias, brancas	2 UFC
25L	3VB2012	Ascomiceta	Pequenas, brancas, bico no centro	50 UFC

As 25 leveduras descritas na tabela 12 foram observadas ao microscópio. Deste modo pode-se confirmar algumas semelhanças, desde a sua forma ao modo de reprodução. No entanto todas as leveduras foram purificadas para posterior identificação.

3.2.2. Identificação das estirpes isoladas

A identificação das estirpes foi efetuada através do método PCR seguida de sequenciação dos produtos de PCR. A região ITS das leveduras isoladas foi amplificada com sucesso através da utilização dos *primers* ITS1 e ITS4, tendo-se obtido bandas com diferentes tamanhos, demonstrando alguma variedade de leveduras como se pode constatar através da observação da figura 4.

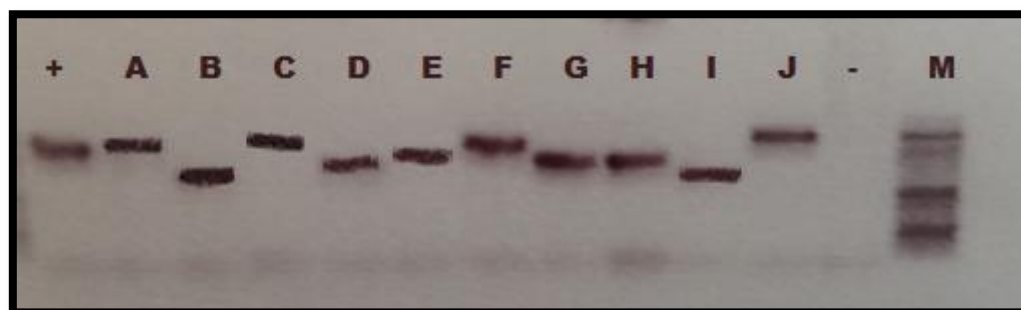


Figura 4- Perfil eletroforético da amplificação do DNA de algumas das leveduras selecionadas para identificação em Gel de agarose a 1,5%

A: *Zygosaccharomyces parabailii*, B: *Pichia manshurica*, C: *Zygosaccharomyces bailii*, D: *Candida parapsilosis*, E: *Rhodotorula mucilaginosa*, F: *Saccharomyces ludwigii*, G: *Candida Cantarelli*, H: *Pichia guilliermondii*, I: *Dekkera bruxellensis*, J: *Saccharomyces cerevisiae*. M – NZY DNA Ladder VI; Contolos: +, *Saccharomyces cerevisiae* (ISA1000); -, *Lactobacillus plantarum* (ISA 3960).

Ao realizar o perfil eletroforético em gel de agarose das diversas leveduras, conseguiu-se demonstrar a amplificação da região ITS para posterior sequenciação.

Após sequenciação da região ITS do DNA ribossomal das estirpes isoladas (Anexo 1), foi na plataforma BLASTn que se obteve a designação das espécies de levedura. Das 25 leveduras que foram sequenciadas foram obtidas 10 espécies diferentes: *Candida cantarelli*, *Candida parapsilosis*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia manshurica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces parabailii*.

A maior parte das amostras de vinho tinto (6) encontrava-se contaminada apenas por uma espécie, enquanto 4 amostras possuíam 2 espécies e uma amostra tinha 3 espécies. Em brancos os 3 vinhos foram contaminados por duas espécies cada.

As espécies identificadas pertencem ao consórcio microbiano dos vinhos, com diferente capacidade de alteração de vinhos (Malfeito-Ferreira, 2014). A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* é considerada como inocente, ou inócua, pois não tem capacidade para se multiplicar em vinhos, sendo frequentemente isolada de ambientes fabris e da natureza. As espécies dos géneros *Pichia* e *Candida*, são contaminantes comuns nas uvas e adegas, tendo capacidade de proliferar em vinhos quando não são cumpridas boas práticas fabris, como presença de oxigénio em depósitos mal atestados e sob reduzidas concentrações de conservantes. Segundo Malfeito-Ferreira (2014), estas leveduras podem aparecer no vinho engarrafado e formarem sedimentos se a carga inicial de contaminação for elevada, podendo também produzir, no gargalo, uma película ou um anel de células aderentes ao vidro, caso a colocação da rolha não impeça a difusão de oxigénio, se o nível de dióxido de enxofre livre for baixo.

Tabela 13 – Identificação das estirpes de leveduras isoladas de vinhos engarrafados.

Amostras	Estirpes	Identificação
Vinho tinto		
1VT2013	1L	<i>Dekkera bruxellensis</i>
	2L	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>
	3L	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>
2VT2013	4L	<i>Candida cantarelli</i>
	5L	<i>Dekkera bruxellensis</i>
3VT2013	6L	<i>Candida cantarelli</i>
5VT(BB)2013	7L	<i>Pichia manshurica</i>
	8L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
6VT(BB)2013	9L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
7VT2013	10L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8VT2014	11L	<i>Pichia manshurica</i>

9VT2013	12L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	13L	<i>Pichia manshurica</i>
10VT2013	14L	<i>Pichia manshurica</i>
13VT2013	15L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	16L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	17L	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>
	18L	<i>Pichia manshurica</i>
14VT2013	19L	<i>Candida parapsilosis</i>
Vinho Branco		
1VB2013	20L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	21L	<i>Pichia guilliermondii</i>
2VB2013	22L	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	23L	<i>Pichia guilliermondii</i>
3VB2013	24L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
	25L	<i>Pichia guilliermondii</i>

Analisando a tabela 13, pode constatar-se que no vinho tinto com a referência 1VT2013 que é proveniente da Adega 1, foram identificadas duas leveduras distintas, *Dekkera bruxellensis* e *Zygosaccharomyces parabailii*, no vinho com a referência 2VT2013 e 3VT2013 são provenientes da mesma Adega. Na Adega 2, que pertence à região da Madeira, foram isoladas as leveduras das espécies *Candida cantarelli* e *Dekkera bruxellensis*. Os vinhos tintos 5VT(BB)2013, 6VT(BB)2013 e 7VT2013 são produzidos na Adega 4, com a diferença que tanto o vinho 5VT(BB)2013 como o 6VT(BB)2013 são embalados em Bag in Box de 5L enquanto que o 7VT2013 é engarrafado numa garrafa de 750mL. Na primeira referencia da Adega 4 foram identificadas duas leveduras *Pichia manshurica* e *Zygosaccharomyces bailii*, no vinho com a referencia 6VT(BB)2013 isolou-se também a levedura *Z. bailli*, e no vinho com a referência 7VT2013 identificou-se *S. cerevisiae*. As referências 8VT2014, 9VT2013, 10VT2013 pertencem à Adega 5 e nestas foram identificadas *Pichia manshurica* na primeira amostra, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia manshurica* na amostra 9VT2013 e na amostra 10VT2013 foi igualmente identificada *Pichia manshurica*. Na amostra 13VT2013 foram isoladas 3 leveduras distintas, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii* e *Pichia manshurica*. Na última amostra de vinho tinto de onde foram isoladas leveduras, corresponde ao vinho tinto com a referência 14VT2013. Relativamente aos vinhos brancos, são três diferentes referencias, todos eles produzidos em três adegas distintas, no entanto são todos produzidos na região do Alentejo. Relativamente ao vinho branco com a referência 1VB2013 foram identificadas *Zygosaccharomyces bailii* e *Pichia guilliermondii*, no vinho branco 2VB2013 foram identificadas *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia guilliermondii*. Por fim, na amostra 3VB2013 identificou-se *Zygosaccharomyces bailii* e *Pichia guilliermondii*. As leveduras encontradas em maior abundancia foram as leveduras menos desejáveis de aparecerem no produto

engarrafado pelo facto de poderem causar alteração. As leveduras das espécies *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces parabaillii*, *Sacharomycodes ludwigii* e *Sacharomyces cerevisiae*, pertencem aos grupos das leveduras de alteração mais perigosas dos vinhos (Malfeito-Ferreira, 2014).

Não foi identificada qualquer levedura nos vinhos do tipo rosé, possivelmente porque não existem condições para a proliferação das mesmas. Devido ao facto dos vinhos do tipo rosé serem todos da mesma adega, pode concluir-se que existem boas práticas de higiene, bem como boas condições para a prevenir a presença de oxigénio durante o processo, uma adequada utilização dos conservantes após a filtração esterilizante durante o engarrafamento.

3.2.3. Identificação das estirpes isoladas durante o processo de engarrafamento

Foram isoladas e purificadas 12 leveduras nas diferentes etapas desde a filtração tangencial até ao engarrafamento. Na tabela 13 encontram-se as diversas etapas pelas quais o vinho passou até ser engarrafado. O padrão de contaminação não permite clarificar qual o efeito dos vários tratamentos na diversidade das espécies isoladas. Tal facto não é surpreendente pois os ensaios foram realizados em ambiente de adega onde não são controláveis nem a homogeneização dos vinhos nem a carga inicial contaminante de cada depósito. De facto nenhuma espécie foi isolada de mais de dois pontos do processo, incluindo a fase de armazenagem do vinho antes da filtração final.

O objetivo principal desta avaliação era determinar a eficácia do DMDC, mas pelas razões expostas não é possível afirmar nem negar que *Pichia* spp. ou *Z. bailli* foram inativadas pelo DMDC. Da mesma forma, não podemos concluir que *C. parapsilosis* é resistente, pois deve ser uma contaminante apenas presente nos depósitos dos vinhos antes do engarrafamento e/ou uma contaminante da enchedora.

No entanto, em termos industriais é relevante o facto apesar do vinho estar contaminado com as espécies mais perigosas dos vinhos (*D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* e *Z. bailli*), no vinho engarrafado apenas foi detetada *C. parapsilosis*, espécie considerada como contaminante sem capacidade de alterar em vinhos (Malfeito-Ferreira, 2014). Assim, o vinho pode ser considerado como tendo sido engarrafado em boas condições tecnológicas.

Tabela 14- Etapas do processo de vinificação e respectivas leveduras identificadas

Etapa	Estirpe	Identificação	Contagens (por ml)
1º: Saída do filtro após filtração tangencial	26L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 UFC
	27L	<i>Pichia manshurica</i>	10 UFC
2º: Depósito de armazenagem	28L	<i>Pichia membranifaciens</i>	1 UFC
	29L	<i>Pichia manshurica</i>	2 UFC
	30L	<i>Dekkera bruxellensis</i>	3 UFC
3º: Depósito de armazenagem 7 dias após a filtração	31L	<i>Candida spp.</i>	1 UFC
4º: Depósito de armazenagem 21 dias após a filtração	32L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2 UFC
5º: Saída do filtro antes do engarrafamento	33L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 UFC
6º: Depósito Antes da aplicação de DMDC	34L	<i>Pichia spp.</i>	1 UFC
	35L	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1 UFC
7º: Depósito Depois da aplicação de DMDC	36L	<i>Candida parapsilosis</i>	3 UFC
8º: Garrafa após engarrafamento	37L	<i>Candida parapsilosis</i>	1 UFC

3.3. Caracterização das estirpes de bactérias

Tal como para as leveduras, todas as colónias referentes a bactérias foram observadas ao microscópio, repicadas e isoladas. Geralmente as bactérias distinguem-se das leveduras por serem bastante mais brilhantes e pegajosas. As bactérias isoladas tanto apareceram nas placas contendo meio seletivo GYC como no meio MRS+vinho.

3.3.1. Testes fenotípicos

Seguidamente foram realizadas colorações de Gram e testes de catálase e oxidase com o propósito de distinguir bactérias lácticas de acéticas. Os resultados dos testes estão expostos na tabela 15.

Tabela 15- Testes fenotípicos realizados para bactérias.

Estirpe	Origem	Gram	Catálase	Oxidase
Vinho Tinto				
1B	4VT2013	(+)	(+)	(-)
2B	4VT2013	(+)	(+)	(-)
3B	5VT(BB)2013	(+)	(+)	(-)
4B	6VT(BB)2013	(+)	(+)	(-)
5B	11VT2014	(+)	(+)	(-)
6B	11VT2014	(+)	(+)	(-)
7B	11VT2014	(+)	(+)	(-)
Vinho Rosé				
8B	1VR2014	(-)	(+)	(-)
9B	1VR2014	(+)	(+)	(-)
10B	2VR2014	(+)	(+)	(-)
11B	3VR2014	(-)	(+)	(-)
12B	3VR2014	(+)	(+)	(-)
13B	4VR2014	(+)	(+)	(-)
14B	5VR2014	(+)	(+)	(-)
15B	6VR2014	(+)	(+)	(-)
16B	7VR2014	(+)	(+)	(-)

Os testes fenotípicos não foram conclusivos na distinção das bactérias. Atendendo ao facto, que as bactérias purificadas apresentavam na sua maioria Gram positivo, catálase positiva e oxidase negativa. Os resultados dos testes fenotípicos para estas bactérias, caso se tratasse de bactérias lácticas, seria: Gram positivo; Catálase negativa e oxidase negativa. Enquanto, se as bactérias identificadas correspondessem a bactérias acéticas, teriam uma resposta ao teste de Gram de negativo, Catálase positiva ou variável e Oxidase negativa, como está apresentado na tabela 8. As respostas das bactérias isoladas poderiam corresponder a bactérias lácticas, visto que o resultado ao teste de gram foi positivo. No

entanto a catalase foi positiva, ou seja, em todas as amostras existiu reação ao peróxido de hidrogénio. O que não acontece no caso das bactérias lácticas. Relativamente ao teste da oxidase, a resposta foi negativa. Para este resultado as bactérias isoladas tanto podem corresponder a bactérias lácticas como acéticas. Pode concluir-se que as bactérias identificadas seriam bactérias formadoras de esporos. De modo a obter uma identificação mais rigorosa, as mesmas bactérias foram sujeitas ao método de sequenciação de DNA, PCR.

3.3.2. Identificação das estirpes isoladas em vinho engarrafado

As 16 bactérias foram sequenciadas através do método PCR. As bactérias foram amplificadas com sucesso com o auxílio dos *primers* AC₁ e AC₃ (dados não apresentados). No entanto também foram amplificadas com o auxílio dos *primers* PA e PH (figura 5), o que levou a concluir, em conjunto com os testes fenotípicos, que as bactérias isoladas não correspondem a bactérias acéticas ou lácticas. Através da observação do gel (figura 5) pode prever-se que não deve existir muita variedade de bactérias, pois os pesos foram bastante idênticos, formando uma única banda nos 1200bp.

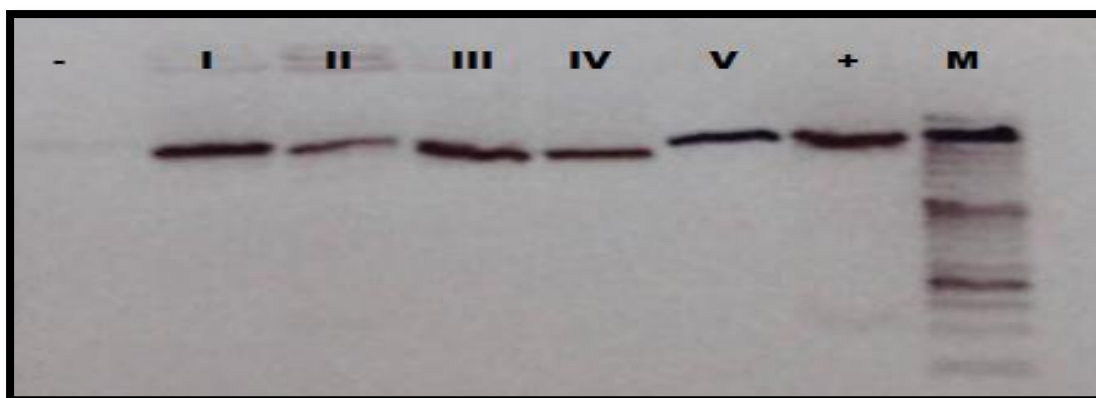


Figura 5- Perfil eletroforético da amplificação do DNA de algumas das bactérias isoladas selecionadas para identificação em gel de agarose a 2,5%. I: *Paenibacillus glucanoliticus*, II: *Bacillus spp.*, III: *Paenibacillus favisporus*, IV: *Bacillus circulans*, V: *Paenibacillus spp.*. M- NZYDNA Ladder VI; controlo -, *Saccharomyces cerevisiae* (ISA1000); controlo +, *Lactobacillus plantarum* (ISA 3960).

Através das sequências (Anexo 2) foi possível traçar o perfil de DNA dos diferentes microrganismos, na plataforma BLASTn. Das 16 bactérias sequenciadas obtiveram-se 7 espécies de bactérias distintas: *Bacillus circulans*, *Bacillus spp.*, *Brevibacillus circulans*, *Paenibacillus favisporus*, *Paenibacillus humicus*, *Paenibacillus pabuli* e *Paenibacillus spp.*.

Tabela 16- Amostras dos vinhos engarrafados e as respetivas bactérias isoladas.

Amostras	Estirpes	Identificação
Vinho Tinto		
4VT2013	1B	<i>Paenibacillus spp.</i>
	2B	<i>Bacillus circulans</i>
5VT(BB)2013	3B	<i>Paenibacillus spp.</i>
6VT(BB)2013	4b	<i>Bacillus spp.</i>
11VT2014	5B	<i>Brevibacillus circulans</i>
	6B	<i>Brevibacillus circulans</i>
	7B	<i>Paenibacillus pabuli</i>
Vinho Rosé		
1VR2014	8B	<i>Paenibacillus humicus</i>
	9B	<i>Paenibacillus spp.</i>
2VR2014	10B	<i>Paenibacillus spp.</i>
3VR2014	11B	<i>Paenibacillus favisporus</i>
	12B	<i>Paenibacillus spp.</i>
4VR2014	13B	<i>Paenibacillus spp.</i>
5VR2014	14B	<i>Paenibacillus favisporus</i>
6VR2014	15B	<i>Paenibacillus pabuli</i>
7VR2014	16B	<i>Paenibacillus spp.</i>

Nos vinhos analisados não foram encontrados quaisquer géneros de bactérias lácticas ou acéticas pertencentes ao consórcio microbiano sugeridas por Rodas *et al.* (2003), ainda que tenham sido usados meios de cultura para as isolar. Apenas foram isoladas bactérias do género *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Bacillus*, formadoras de esporos e que não são consideradas como pertencentes ao consórcio microbiano do vinho. De facto, as bactérias destes géneros geralmente têm a sua proveniência no solo e água o seu pH ótimo varia entre 5 e 9. O vinho não é um meio propício para a propagação deste género de microrganismos. No entanto estas bactérias já foram isoladas igualmente em vinho, num estudo realizado por Ultee *et al.* (2013). O mais provável é que sejam contaminantes ambientais (e. g. enchedoras, rolhadoras, garrafas vazias, rolhas, cápsulas) presentes nos vinhos na forma de esporos, sem condições de proliferação, devendo ser consideradas como indicadoras de higiene do processo de fabrico.

O vinho rosé, provem todo da mesma adega, e possui um baixo teor alcoólico, perto de 0,5%. Atendendo ao facto que nos vinhos em questão só foram identificadas bactérias esporuladas, leva a crer que as condições de higiene da adega e todo o processo de produção do vinho são irrepreensíveis ao nível dos equipamentos, caso contrário seriam identificadas leveduras. As bactérias esporuladas são isoladas, pois, provavelmente, a higienização do equipamento ou até mesmo a água de enxaguamento das garrafas contém as bactérias formadoras de esporos.

4. Conclusões

O consórcio microbiano do vinho é constituído por uma diversidade elevada de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, podendo estes influenciar positiva ou negativamente a sua qualidade.

No presente trabalho, foram analisados diversos vinhos de forma a verificar se os microrganismos isolados correspondiam ao conhecimento atual sobre o tema. A tabela 17 sumariza todos os resultados obtidos e permite perceber que a originalidade deste estudo esteve na frequência de isolamento de bactérias esporuladas com espécies raramente identificadas em vinhos engarrafados. A elevada frequência de *Paenibacillus* spp. como único contaminante pode estar relacionada com o facto de ter sido analisada uma elevada proporção de amostras de vinho rosado só de uma adega.

Em relação às leveduras, a originalidade residiu na identificação da espécie *Z. parabailii* devido à atual definição taxonómica. Esta espécie deve ser incluída no grupo das leveduras de alteração perigosas pois é muito próxima de *Z. bailii* em termos filogenéticos.

A elevada frequência de isolamento das espécies de alteração perigosas, maior do que a esperada, pode estar relacionada com a utilização de mostos concentrados na edulcoração de vinhos. De facto, tem-se observado uma tendência crescente no teor de açúcar residual de vinhos tidos como secos, com o fim de tornar os vinhos “macios” (Loureiro *et al.*, 2016).

Tabela 17- Frequência de isolamento e significado tecnológico das espécies isoladas em 25 vinhos engarrafados onde foi detetada contaminação microbiana.

Significado tecnológico	Espécie	Frequência de isolamento (%)	Nº de amostras como único contaminante
Leveduras de alteração perigosas	<i>Z. bailii</i>	20	1
	<i>Z. parabailii</i>	4	0
	<i>S. cerevisiae</i>	8	0
	<i>D. bruxellensis</i>	8	0
	<i>S. ludwigii</i>	4	0
Leveduras de contaminação	<i>C. cantarelli</i>	8	1
	<i>C. parapsilosis</i>	8	2
	<i>P. guilliermondii</i>	12	0
	<i>P. manshurica</i>	20	2
	<i>R. mucilaginosa</i>	4	1

Bactérias esporuladas	<i>Bacillus</i> spp.	8	1
	<i>Brevibacillus</i> spp.	4	0
	<i>Paenibacillus</i> spp.	40	8

Como trabalhos futuros seria importante verificar se realmente as espécies de leveduras sem capacidade de alteração e as bactérias esporuladas, isoladas durante este estudo, têm alguma capacidade para crescer em vinhos quando as condições são menos agressivas. Por exemplo, a tendência para usar menos dióxido de enxofre, vinhos sem álcool e com teor elevado de açúcar residual podem constituir fatores que propiciem o desenvolvimento destes microrganismos. Em segundo lugar, convinha avaliar se *Z. parabailii* mantém a mesma capacidade de alteração que *Z. bailii*, sendo interessante determinar se a conhecida variabilidade de resistência intraespecífica aos agentes microbianos pode ser estar de acordo com esta nova delimitação taxonômica.

5. Bibliografia

- Alonzo, A., Belda, I., Santos, A., Navascués, E., Marquina, D. (2014). Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts. *Food Control*, 51: 129-134
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 243–59.
- Bartowsky, E.J., Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. *International Journal of Food Microbiology* 125: 60-70.
- Belitz, H., W.G, Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry - 3th Revised Edition*, ed. Springer. Garching.
- Bisson, L.F., Joseph, C.M. (2009). Yeasts. In: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp.. 47–60.
- Bisson, L.F., Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E., Walker, M.A., Lapsley, J.T. (2002). The present and future of the international wine industry. *Nature*, 9: 418-696.
- Capozzi, V., Garafolo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., Spano, G., (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181: 75-83.
- Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. (2011). *Molecular Wine Microbiology*. USA: Elsevier Inc..
- Carvalho, J., Filtração dos Vinhos - Curso intensivo de conservação, estabilização e engarrafamento de vinhos. Laboratório de Química Enológica da DRAPC - EVB Anadia.
- Christaki, T., Tzia, C. (2002). Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*, 13: 503–517.
- Cocolin, L., Ercolini, D., (2008). Wine Fermentation. In: *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, pp. 162–192.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25: 422–427.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H., Fleet, G.H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 539-245.

Deak, T., Beuchat, L.R.(1995). Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages, *Food Microbiology*, 165–172.

Delanoe, D., Nathalie, S., Abasq, P., Bertrand, P., Letard, S., Simon, F. (2005). Différents types de désordres observés dans les boissons. In: Troubles et Dépôts des Boissons Fermentées et des Jus de Fruits - Aspects Pratiques du Diagnostic. OENOPLURIMÉDIA, pp. 13–35.

Divol, B., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A.(2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22: 169-178.

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11–22.

Fleet, G.H. (2006). The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production, em: Yeasts in Food and Bevarages. Springer, Germany, pp. 1–12.

Fracassetti, D., Gabrielli, M., Costa, C., A. T., Barber, T., Tirelli, A., Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Journal of Food Control*, 60: 606-614.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., (2007a). Identification of Wine Microorganisms. In: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 241–272.

García-Ruiz, A., Crespo, J., Lopez-de-Luzuriaga, J.M.,Olmos, M.E., Monge,M., Rodríguez- _Alfaro, M. P., Martín- _Alvarez, P.J.,Bartolome, B.,Moreno-Arribas, M.V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control* 50: 613-619.

Genisheva. Z., Mussatto. S.I., Oliveira. J.M., Teixeira. J.A.(2013). Malolactic fermentation of wines with immobilized lactic acid bacteria – Influence of concentration, type of support material and storage conditions. *Food Chemistry*. 138: 1510-1514.

Hasler, C.M., (1998). Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*. 52: 61–72.

Hudelson, J., (2011). It Grows in Wine! In: Wine Faults- Causes, Effects and Cures. The wine appreciation guild, San Francisco, pp.38-55.

Inês, T. Tenreiro, R. Tenreiro, A. Mendes- Faia, (2008). A review: Wine lactic acid bactéria – Part I, *Ciência Téc. Vitiv*.23: 81-96.

Instituto da Vinha e do Vinho, 2014. Wines and Spirits of Portugal. Disponível em: <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=72&flash=1>.

Instituto da Vinha e do Vinho, 2015. Mercado Nacional Vinhos Tranquilos- Janeiro a Junho/2015.

International Organisation of Vine and Wine, 2013. Statistical report on world vitiviniculture.

Juarez-Jimenez, B., Rodelas, B, Martinez-Toledo, V.M., Gonzalez-Lopez,J., Crognale, S., Gallo, A.M., Pesciaroli, C., Fenice, M., (2008). Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the east sector of central Tyrrhenian Sea. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 27-31.

Kunkee,F., Bisson. L.,(1993). Wine-making Yeasts, em: The Yeasts. Academic Press Limited, London, pp. 69–118.

Leifert, W., Abeywardena, M., (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*. 28: 729-737.

Lepe, J. A., Leal, B. (1992). Microbiologia enologica. Fundamentos de vinificación. Mundi-Prensa, Madrid.

Lerm, E., Engelbrecht, L., Toit, M., (2010). Malolactic Fermentation : The ABC ' s of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 31: 186–212.

Lonvaud-Funel, A., (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 317–331.

Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Strehaiano, P., (2010). Les traitements pour la maîtrise des micro-organismes et la stabilité microbiologique des vins, em: Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications. Lavoisier, Paris, pp. 267–301.

Loureiro, V. (1996). Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade. *Revista dos Vinhos*: 42-46.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23–50.

Lucas, D., *Influência da adição de Dimetil dicarbonato (DMDC) em vinhos tintos*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

Malfeito-Ferreira, M. (2010). Yeasts an wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61: 95-102.

Malfeito-Ferreira, M., (2014). Wine Spoilage Yeasts and Bacteria, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 805–810.

Malfeito-Ferreira, M., (2014). Wine Spoilage Yeasts and Bacteria, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 805–810.

Malfeito-Ferreira, M.; & Loureiro, V. (1995) - Os problemas microbiológicos do engarrafamento de vinhos: uma questão ainda em aberto. *Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, Évora.

Mislivec, P.B., Beuchat, L.R. e Cousin, M.A. (1992) - Yeasts and molds. In: Vanderzant, C. e Splittstoesser D.F. (Eds.). in: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* American Public Health Association. pp. 239-249.

Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 265-286.

Nisiotou, A. A., Dourou, D., Filippousi, M-E., Diamantea, E., Fragkoulis, P., Tassou, C., Banilas, G., (2015). Genetic and technological characterisation of vineyard and winery-associated lactic acid bacteria. *BioMed research International*. Research article.

Palacios, A. (2005). Organoleptic defects caused by uncontrolled malolactic fermentation. *Malolactic fermentation in wine* (R. Morenzoni & K.S. Spelcht), Lallemand Inc, Canada. pp. 7-17.

Pascal Ribéreau-Gayon, Y.G., Alain Maujean, Denis Duboudieu, 2. *Chimie du Vin-Stabilisation et traitements. Traité D'Enologie* - Dunod, 1998.

Pérez-López, F.R., Chedraui, P., Haya, J., Cuadros, J.L., (2009). Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*. 64: 67–79.

Petri. A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J., König, H. (2013). Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*. 33: 48-54.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J. and Augustyn, O.P.H. (1999). A review: Yeast biodiversity in Vineyards and wineries and its importance to South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 20:61-75.

Rayess. I., Albasi. C., Bacchin. P., Taillandier. P., Raynal. J., Mietton-Peuchot. P., Devatine. A.,(2011). Crossflow microfiltration applied to oenology: A review. *Journal of Membrane Science*. 382: 1-19.

Regulamento (CE) nº53. 2011. Regras de execução para categorias de produtos vitivinícolas, para práticas enológicas e restrições que lhes são aplicadas. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 6.

Regulamento (CE) nº666. 2009. Regras para categorias de produtos vitivinícolas, práticas enológicas e restrições que lhes são aplicadas. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 59.

Riedel, H., Min, N., Thaw, M., Akumo, D.N., (2012). Wine as Food and Medicine, in: Riedel, H., Saw, N., Akumo, D., Kütük, O., Smetanska, I. (Eds.), Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. InTech, 399–418.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26: 412–422.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 169–180.

Romano, P., G.S.,(1993) Sulfur dioxide and wine microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology* - Harwood Academic Publishers.

Silva, K., Salles, J., Seldin, L., Van Elsas, J.D., (2003) Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods* 54: 2013-231

Stratford, M.,(2006). Food and Beverage Spoilage Yeasts. in: Querol, A Graham. H. Fleet (Eds.), in: *Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 338-363.

Ultee, A., Wacker, A., Kunz, D., Löwenstein, R., König, H., (2013) Microbial Succession in Spontaneously Fermented Grape Must Before, During and After Stuck Fermentation, *Enol. Vitic.*, Vol. 34, N°1, Germany, pp. 68-77.

Versari, A., Parpinello, G.P., Cattaneo, M., (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 23: 447–455.

Vicenzini, M., Romano, P., Farris, G.A., (2005). Capitolo 3- Ecofisiologia dei lieviti vinari, in: *Microbiologia del vino*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 63-80.

Zappino,M., Cacciotti, I., Benucci, I., Nanni, F., Liburdi, K., Valentini,F., Esti. M.,(2015). Bromelain immobilization on microbial and animal source chitosan films, plasticized with glycerol, for application in wine-like medium: Microstructural, mechanical and catalytic characterisations. *Food Hydrocolloids*. 45: 41-47.

Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., (2013). Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology* 4: 57–78.

Anexos

Anexo1. Leveduras isoladas e respetiva sequência de DNA.

[illegible]

Anexo 2. Bactérias isoladas e respetiva sequência de DNA.

Espécie	Sequencia de DNA
1B- <i>Bacillus circulans</i>	tttt agtt agc ggc ggc acg ggt g agt aac ac gtg ggc aac ctg cct gta ag act ggg ata ac ttc ggg aa ac c gg ag cta at acc gg ata ac c tttc ctac tcat gtagg aag gct gaa gac ggt tta cgt gtc act tac ggat ggg ccc ggc ggc att ag ctag ttggt gag gta ac ggct cacc aagg gc agc gat gc tagc cgac ctg ag ag ggt g atc ggc ac ac tggg act g ag ac cag gcc caga ctcc tac ggg aggc agc ag tagg gaat ctcc cgc aat g gac gaa gct g ac g g gac aac gc c gct g agt g at ga ag gttt c g gatc gtaa aac tct gtt gta ggg a gaa c aag tac gag agta a ctgc t cgt acc ttg ac ggta c cta acc a gaa agc c ac g gcta act ac gtc cc agc ag cgc ggta atac gtag tggc aag c gtt gtc c gga att att g agc gata gc g cgc g c agc g ggt c ctt a ag tct g at gta aag ccc ac g gtc ag ac gtc aggt g c att gta c act g gg ag ac tt g ag tgc a gaa c aga ag a g tgg ag tgc c ac g t gta gc g gtag g at g c gta g ag at g t g g agt aac c c a g tgg c ga at g c g act t t g g t c t g a g t g a c g c t g a t c t g c g a a t g c g t g c g g a g a c a g a c g a t t a g a t a c c t g g t a g t c a c g c c g t a t a c g a t g a g t a a g t c g t a t a c g t a t a g a t g a c a t a a t c g t a c t t g c t c g t a g t t a g c g g c g g a c g g g t g a g t a c a c g t g c c a a c c t g c c t a t a a t a c t g g a t a a c t t c g t c a a a c c g t t a g c t a a t a c c g g a t a a t a c t t c t c t c a t g a g g a a t g t t g a a g g a t g c t t t c g c t a t c a c t t a c a g a t g t c c g c g g c g c a t t a g c t a g t t g c c t t c g g c a c t g g t c a c c a c g c c a c g a t g c t a t t c t a c c g g t a g g t g a t g t c c a c t t g t c t c t a g a c a c g g c c t c a c t c t a t c c g a t g c a c t c c a c g g a t t c t c c g a a t g t c a a t c t g a t g g a c a a c g c g c g c g c g c t t a c g c c t t c g a t c g a g a a c t c t t g t t a c t a a g a t t a c c a c g g c a g t a g c g c g g t a c t t g a c g g t t c t a g c c t a a a t a c c g t g g a t a t a c t g t g g t a c t c c g c a c t t g t a c g t c c c t a a c a a g c g a t g t c g c g a t t g g a c c t t c a t c g c a c g t g t t c c t t a g t t a a t g t c a t c g a t t a c g g a t a t t c g c a c t g c t g c g c t c c a g a c t g a t a t g t g a g t c t c a g a c a c a a t g t g a t a t a c t c t c t c g t g c a a t g a c t c a t t t g c a t g a a c a c c g t g t c t c a g c c a c t a t c t g a t c c a c t g a c c c t t c t c t g t a c a g t g g a a a c a t c t t c a t c a t t a c c a g g a a t c a a t g t a a c a g g a t a g c a c t g t t c c g g a t c a c
2B- <i>Bacillus spp.</i>	atc cct g ag att agc ggc g gac g ggt g agt aac a c g t g g c a a c t g c c t a t a a g a c t g g g a t a a c t t c g g g a a c c g g a g c t a a t a c c g g a t a c g t t c t t t t c t g c a t g a g a a g a t g g a a g a c g g t t a c g c t g t c a c t a t a g a t g g g c c c g c g g c g c a t t a g c t a g t g g t g a g g t a a t g g c t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t a t c g g c c a c a c t g g g a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c c t a c g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t c c g c a a t g g a c g a a g t c t g a c g g a g c a a c g c c g c g t g a a c g a a g a g c c t t c g g g c g t a a a g t t c t g t t a g g g a a g a a c a a g t a c c a g a g t a a c t g t g t a c c t t g a c g g t a c c t a a c c a g a a a g c c a c g g c t a a c t a c g t g c c a g c a g c c g g g t a a t a c t g a g t g g c a a g c g t t g t c c g g a a t t a t g g c g t a a a g c g c g c a g g t g g t c c t a a g t c t g a t g t a a g c c c a c g g c t a a c c g t g g a g g g t c a t t g g a a a c t g g g a a c t g a t g c a g a a g a g g a a g t g g a a t t c a a g t g t a g c g g t g a a a t g c g t a g a g t t g g a g g a a c a c c a g t g g c g a a g g c g a c t t t c t g t g t a a c t g a c a c t g a a g c g c g a a a g c g t g g g a g c a a a c a g g a t t a g a t a c c c t g t a g t c c a c g c c g t a a a c a g a t g a t g c t a a g t g g t a g g t t t c c g c c c t t t a t g c t g a c g t a a c g c a t t a a g c a c t c c g c c t g g g a g t a c g g c c g c c a g g c t g a a a c t c a a a g g
3B- <i>Brevibacillus circulans</i>	ggagc t t g t c t c t g a g g t a g c g g c g g a c g g g t g a g t a a c a c g t a g g t a a c t g c c t g t t a g a c t g g g a t a a c c a c g g a a a c g t g a g c t a a t a c c g g a t a t t c a t c t t c c a c c t g g g a a g a t g a t g a a t a c c g g a g c a a t c t g t a c t t g c a g a t g g g c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g t a g g g t a a c g g c c t a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t g a a c g g c c a c a c t g g g a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t c c g c a a t g g c g a a a g c c t g a c g g a g c a a c g c c g c g t g a g t a g a g g t t t c g g a t c g t a a a g c t c g t t g c c a g g g a a g a c g t c t a t a g a g t a a c t g c t a t g a g t g a c g g t a c c t g a g a a g a a g c c c g g g c t a a c t a c g t g c c a g c a g c g c g g t a t a c g t a g g g g c a a g c g t t g t c c g g a a t t a t g g c g t a a g c g c g c g a g g c g c a t t a a g t c t g g t g t t a a t c c g a g g c t a a c c c c g g g t c g c a c t g g a a a c t g g t g g c t t g a g t g c a g a a g a g a g a g t g t a t t t c a c g t g t a c g c g t g a a a t g c g t a c a t a t g t g g a g g a a c a c a g t g g c g a a g c g a c t c t g g c t g t a c t g a c g c t g a g g c a g a a a g c g t g c c g a g c a t a c a g g a t t a g a t a c c c t g g a a g t c a c g c a g t c a a c g a t a a a t c g g g a a g a t t a g c g g c g g a c g g g t g a g t a a c a c g t a g g c a a c t g c c t c a a g a c t g g g a t a a c t c c g g a a a c g g a t g c t a a t a c c g g a t a t g c g g t t c t c t c t g g a g a t c g g g a a g a c g g a g c a a t c t g t a c t t g g g a t g g g c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g g t a g g t a a c g g t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t a t c g g c a c c c t g g t a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a t g a a t c t t c c g a a t g g a c g c a a g t c g a c g t a a c a a c g c c g c g t g a t g c g c a t t a c t c g g g t g t a a g c t c t g t g c c g c c c a g a a c g g t t g g a a g a t a c t g c t t c g c c a t g a c g g t a c c t g t c a t c a g g c c a g g c t a t g a c t g g c a g c t c c g c t a t a c t a c t c t c g t g g c g t t g a c c g t t a t t g g g c g t a a t g c g t g c g t a c g g g c t t g t a t t c g c g t t t a c t t g t t c t c a a c a c t a c t a g a c g g t g c a a c t g c t a g g c t t g a g t g c g a g c a t g a a c g t g g a t t c c g a g t a c c g t c a a g t g t c g t c a a t g c a g a g g c g a a g c g a c c t t c t g a g t g t a g c t c a c a t g a c a c t c c a a g c g t g c a g a t a t a c g g c t t c a t a c c t g t a g t c g c g a g t a c g a t a g g c t a a c g t c g g t t c t g a g a c a t c g
4B- <i>Paenibacillus favisporus</i>	atc t c t a c t c a a a c t c t a g c g t t g a c c g g g a c c t c a c a c g c a g t c a a a c a t c t c t t t a a t t g g g a c a a c t a c c g g a a a c c g g t a g c t a a t a c c g a a t a g t t g t t t c t g c c t g a a g a a a c t g g a a g a c g g a g c a a t c t g t a c t t g g g a t g g c c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g t g g g t a a c g g c t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t a t c g g c a c a c t g g t a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t t c g c a a t g g g c g a a a g c c t g a c g g a g c a a t g c c c g t g a t g a t g a a g g t t t c g g a t g a g a c t c t g t t g c c a g g g a a g a a c g c t t g g a g a g a t a g c t g t c t a g g t g a c g g t a c c t g a g a a g a g a c c c g g c t a a c t a c g t g c c a g c a g c c g c g g c a a t a c g g a g g g g g c a a g c g t t g t c c g g g a t t a t t g t c g t a a a g c g c g c a g t g g g c g t t a a g t c t g t g t t a g t c c g g a g c t a t a c t g t g t c g a c g g a a a a c t g t g t a c g t g a c t g c a t a a c a g t a t a g t g g a a t t c a t g t g t a g c g g t g t a a t a g t a t a t g t g g a a a c a c a g t g c a g a a g g t a a c t c t c g g g c c t g a a a c t g a c g t g a g c g g a g a t c g t g c g g a g t a t a c a g g a t t a t a c c c t g t a a t c a c g c c g c a g a c g t a g c t a c t a
5B- <i>Paenibacillus humicus</i>	aaa aggt ttagc ggc ggac ggg t g a g t a a c a c t a g g c a a c t g c c t c a a a g a c t g g g a t a a c t c c g g a a a c g g a t g c t a a t a c g g a t a t g c g g t t t c t c t c t g g a g a t c g g g a a g a c g g a g c a a t c t g t a c t t g g g a t g g g c c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g t g g g t a a c g g c t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t a t c g g c a c a c t g g c a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t t c g c a a t g g g c g a a a g c c t g a c g g a g c a a t g c c c g t g a t g a t g a a g g t t t c g g a t g a g a c t c t g t t g c c a g g g a a g a a c g c t t g g a g a g a t a g c t g t c t a g g t g a c g g t a c c t g a g a a g a g a c c c g g c t a a c t a c g t g c c a g c a g c c g c g g c a a t a c g g a g g g g g c a a g c g t t g t c c g g g a t t a t t g t c g t a a a g c g c g c a g t g g g c g t t a a g t c t g t g t t a g t c c g g a g c t a t a c t g t g t c g a c g g a a a a c t g t g t a c g t g a c t g c a t a a c a g t a t a g t g g a a t t c a t g t g t a g c g g t g t a a t a g t a t a t g t g g a a a c a c a g t g c a g a a g g t a a c t c t c g g g c c t g a a a c t g a c g t g a g c g g a g a t c g t g c g g a g t a t a c a g g a t t a t a c c c t g t a a t c a c g c c g c a g a c g t a g c t a c t a
6B- <i>Paenibacillus pabuli</i>	aaa aggt ttagc ggc ggac ggg t g a g t a a c a c t a g g c a a c t g c c t c a a a g a c t g g g a t a a c t c c g g a a a c g g a t g c t a a t a c c g g a t a t g c g g t t t c t c t c t g g a g a t c g g g a a g a c g g a g c a a t c t g t c c t t g g g a t g g g c c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g t g g g t a a c g g c t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c c g a c c t g a g a g g g t a t c g g c a c a c t g g c a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t t c g c a a t g g g c g a a a g c c t g a c g g a g c a a t g c c c g t g a t g a t g a a g g t t t c g g a t g a g a c t c t g t t g c c a g g g a a g a a c g c t t g g a g a g a t a g c t g t c t a g g t g a c g g t a c c t g a g a a g a g a c c c g g c t a a c t a c g t g c c a g c a g c c g c g g c a a t a c g g a g g g g g c a a g c g t t g t c c g g g a t t a t t g t c g t a a a g c g c g c a g t g g g c g t t a a g t c t g t g t t a g t c c g g a g c t a t a c t g t g t c g a c g g a a a a c t g t g t a c g t g a c t g c a t a a c a g t a t a g t g g a a t t c a t g t g t a g c g g t g t a a t a g t a t a t g t g g a a a c a c a g t g c a g a a g g t a a c t c t c g g g c c t g a a a c t g a c g t g a g c g g a g a t c g t g c g g a g t a t a c a g g a t t a t a c c c t g t a a t c a c g c c g c a g a c g t a g c t a c t a
7B- <i>Paenibacillus spp.</i>	aaa aggt ttagc ggc ggac ggg t g a g t a a c a c t a g g c a a c t g c c t c a a a g a c t g g g a t a a c t c c g g a a a c g g a t g c t a a t a c c g g a t a t g c g g t t t c t c t c t g g a g a t c g g g a a g a c g g a g c a a t c t g t c c t t g g g a t g g g c c t g c g g c g c a t t a g c t a g t t g g t a g g t a a c g g t c a c c a a g g c g a c g a t g c g t a g c g g a c c t g a g a g g g t a t c g g c a c a c t g g g a c t g a g a c a c g g c c a g a c t c t a c g g g a g g c a g c a g t a g g g a a t c t c c g c a a t g g a c g a a g t c g a g g a g c a a c g c c g c g t g a g t a g g a a g g c c t t c g g g t g t a a g c t c t g t t g c c a g g g a a g a a c g g g t g g a a g a g t a a c t g c t t c g c c a t g a c g t a c c t g a g a a g a a g c c c g g c t a a c t a c g t g c a g c a g c c g c g g t a a t a c t a g g g g g c a a g c g t t g t c c g g a a t t a t g g g c g t a a a g c g c g c a g g c g g c t t t g t a a g t c c g g t g t t a t c t t g g g c t c a a c c c a a g t c g a c g g g a a a c t g c a a g g c t t g a t g c a g a a g a g a a a g t g g a a t t c a c g t g a g c g g t g a a a t g c g t a g a g a t g t g a g a a c a c a g t g g c g a a g g c g a c t t t g g g c t g t a a c t g a c g c t g a a g c g c g a a g c g t g g g a g c a a a c a g g a t t a g a t a c c c t g g t a g t c a c g c c g t a a a c g a t g a